



EMERSON CLAYTON AMARO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS
PRONTOS PARA CONSUMO E AMBIENTES EM CRECHES DA REDE
PÚBLICA DE CAMPINAS/SP**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

EMERSON CLAYTON AMARO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS
PRONTOS PARA CONSUMO E AMBIENTES EM CRECHES DA REDE
PÚBLICA DE CAMPINAS/SP**

Orientador: Prof. Dr. Jose Luiz Pereira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**Este exemplar corresponde à versão final da tese
defendida pelo aluno Emerson Clayton amaro
e orientado pelo prof. Dr. Jose Luiz pereira**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE

ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Am13a Amaro, Emerson Clayton, 1988-
Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo e ambientes em creches da rede pública de Campinas/SP. / Emerson Clayton Amaro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Jose Luiz Pereira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Segurança alimentar. 2. Intoxicação alimentar.
3. Alimentos - Contaminação. I. Pereira, Jose Luiz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the microbiological quality of meals and environments samples from kindergartens in Campinas/SP

Palavras-chave em Inglês:

Food poisoning

Food security

Food - Contamination

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Jose Luiz Pereira [Orientador]

Tomomasa Yano

Isis Serrano Silva

Data da defesa: 27-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jose Luiz Pereira

Orientador – DCA / FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Membro Titular – IB / UNICAMP

Dra. Isis Serrano Silva

Membro Titular - Wisetec Centro de Pesquisa

Prof^a Dra. Lucia Regina Durrant

Membro Suplente - DCA / FEA / UNICAMP

Prof^a Dra. Dirce Yorika Kabuki

Membro Suplente - DCA / FEA / UNICAMP

DEDICATORIA

Ao meu Deus que sempre esteve comigo em todos os momentos.
À minha filha que soube compreender a minha ausência em muitos momentos, momentos esses
que dediquei neste trabalho.
À minha esposa que também me apoiou e não questionou em nem um momento as madrugadas
que passei trabalhando em meu computador.
À minha mãe, exemplo de mulher, que sempre me deu força e acreditou no meu potencial.
Ao meu segundo pai e amigo José Arruda Filho, pelo carinho e apoio em todas as horas.
Em memória ao meu pai, que me deu muitos ensinamentos que guardarei no meu coração.
À minha amada irmã e meu querido irmão pelo incentivo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Luiz pela orientação, apoio e confiança a mim dispensada, sempre se mostrou próximo e pronto a ajudar, meu muito obrigado!

Ao meu amigo e companheiro Rafael que me ajudou nas coletas, no laboratório, enfim foi meu co-orientador não oficial, obrigado meu amigo, sempre vou ser agradecido pela ajuda.

Agradeço minha amiga Norma Teruko que me deu várias dicas e orientações na realização deste trabalho, agradeço também pelas nossas conversas sempre produtivas me ajudando a encontrar um melhor caminho, não apenas neste trabalho, mas na vida.

À Dona Laura que me auxiliou neste trabalho com a preparação das vidrarias e materiais, também pela amizade e companheirismo.

Em especial à Prof^a Lucia Regina Durrant, que me acolheu na FEA desde 2005, onde tive o privilégio de trabalhar ao seu lado cinco anos; me incentivou a estudar e deu oportunidade de concluir minha graduação e por consequência deu todo apoio necessário para o ingresso no mestrado na FEA. Pessoa amiga sempre pronta a ouvir e ajudar, que Deus continue te iluminando e ajudando em tudo.

Aos amigos da Aférese do Hemocentro, Eduardo, Iara e Mariuce que seguraram a barra enquanto eu fazia as coletas e realizava parte de meus experimentos. Sem a ajuda de vocês não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Gilson e Cleber que sempre estiveram ao meu lado dando apoio nas situações difíceis, sempre com palavras de encorajamento.

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Histórico da merenda escolar	2
2.2 Segurança Alimentar e Nutricional	3
2.3 Alimento Seguro	6
2.4 Doença Transmitida por Alimento	7
2.5 Principais características dos agentes etiológico de surtos com DTAs no Brasil	16
2.5.1 <i>Salmonella</i> spp.	16
2.5.2 <i>Staphylococcus</i> spp.	17
2.5.3 <i>Bacillus cereus</i>	18
2.5.4 <i>Escherichia coli</i>	19
2.5.5 <i>Clostridium perfringens</i>	20
2.6 Fatores determinantes de surtos de DTA	21
2.7 Surtos de DTAS em escolas e creches	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 GERAIS	25
3.2 ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 AMOSTRAGEM	26
4.1.1 Amostragem dos alimentos prontos	26
4.1.2 Amostras de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores	27
4.2 MÉTODOS PARA ANÁLISES DOS ALIMENTOS	28
4.2.1 Preparo das amostras de alimentos para análises.	28
4.2.2 Contagem de Coliformes Termotolerantes:	28
4.2.3 Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	29
4.2.4 Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	29
4.2.5 Contagem de Clostrídios Sulfito Redutores a 46 °C em Alimentos	30
4.2.6 Pesquisa de presença e ausência de <i>Salmonella</i> spp. em Alimentos	30
4.2.7 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios	31
4.3 MÉTODOS PARA ANÁLISES DE SUPERFÍCIES, UTENSÍLIOS E MÃOS DE MANIPULADORES	31
4.3.1 Contagem de Coliforme termotolerante	31
4.3.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	32
4.3.3 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Resultados das análises dos alimentos	33
5.1.1 Resultados creche A	33
5.1.2 Resultados creche B	36
5.1.3 Resultados creche C	37

5.1.4 Resultados creche D	39
5.2 Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores.....	41
5.2.1 Resultados creche A	41
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Contaminação dos alimentos na cadeia alimentar.....	7
FIGURA 2 - Número de casos de diarreia por faixa etária, Pará 2000- 2004.....	10
FIGURA 3 – Surtos de DTA no Brasil entre os anos de 2000 a 2011.....	11
FIGURA 4 – Agentes etiológicos identificados por surto alimentar Brasil, 2000-2011.....	12
FIGURA 5 – ocorrências relacionado com o surto de DTA, Brasil 2000 a 2011.....	19
FIGURA 6 – Porcentagem de surtos notificados de DTAs no Estado de São Paulo entre 1999 -2008 segundo o local ocorrência.....	19
FIGURA 7 – Distribuição dos grupos de alimentos servidos em Creches da rede Pública Campinas.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Gastos com alimentação escolar vs. alunos atendidos.....	02
TABELA 2 – . Legislações relacionadas a Segurança de Alimentos no Brasil.....	04
TABELA 3 – Comparativo dos registros computados por MDDA e SINAN-net. Regiões, Brasil, 2007-2010.....	15
TABELA 4 – Creche A - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).....	35
TABELA 5 - Creche das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).....	37
TABELA 6 – Creche C - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).....	39
TABELA 7 – Creche D - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento	40
TABELA 8 - Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche A.....	41
TABELA 9 - Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche B.....	42
TABELA 10 - Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche C.....	43

RESUMO

Várias doenças são transmitidas por alimentos e existem grupos de indivíduos mais vulneráveis, em especial as crianças, sendo desta forma prioridade nas ações de atenção à saúde. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem mais de 1,8 milhões de mortes de crianças com menos de cinco anos de idade devido ao consumo de alimentos contaminados. Os agentes etiológicos mais frequentes em surtos no Brasil são a *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. Desta forma essa pesquisa teve o intuito de avaliar se os alimentos prontos para consumo servidos nas creches em Campinas (SP) cumprem os requisitos exigidos pela legislação. A pesquisa foi realizada em quatro creches na cidade de Campinas/SP (em diferentes regionais), escolhidas por sorteio com o auxílio da Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Campinas. Foram analisados alimentos prontos para o consumo servidos para crianças de 1 a 4 anos, sendo a refeição escolhida o almoço, também foram analisados superfícies, utensílios e mãos de manipuladores. Quanto a contagem de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de aeróbios mesófilos, essas amostras foram coletados com auxílio de *swab* estéreis. As análises nos alimentos constataram que 97% dos alimentos estão dentro dos limites estabelecidos, 6,6% das amostras apresentaram presença de coliformes termotolerantes, sendo que 3,3% das amostras apresentaram presença de *E.coli*. A pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva nos alimentos indicaram que 3,3% das amostras continham esse tipo de micro-organismo, mas em baixa contagem, estando dentro do permitido pela legislação. As análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores apresentaram contagem de coliformes termotolerantes <3 NMP/g, para contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, 61% das amostras apresentaram presença destes micro-organismos e para contagens de aeróbio mesófilos, 100% das amostras apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA). Com os resultados apresentados no presente estudo, fica evidente a necessidade de melhorar as condições higiênico-sanitárias do ambiente de preparo dos alimentos e dos manipuladores dos alimentos.

Palavras chaves: segurança alimentar, intoxicação alimentar e alimentos contaminados

ABSTRACT

Several diseases are transmitted by food and there are groups of individuals that are more vulnerable than others, especially children, thereby being priority actions in health care. According to the World Health Organization (WHO), there are more than 1.8 million deaths of children under the age of five due to consumption of contaminated food. The most common etiologic agents in outbreaks in Brazil are *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. Therefore this study aimed to assess whether the ready to eat foods served in child care centers in Campinas (SP) meet the requirements mandated by the legislation. The research was conducted in four kindergartens in the city of Campinas / SP (in different regional), chosen at random with the assistance of the Coordinator for Health Surveillance of Campinas. We analyzed food ready for consumption served to children aged 1 to 4, for lunch. Analyses of surfaces, utensils and hands of the manipulators, as well as the counting of thermo tolerant coliforms, coagulase positive *Staphylococcus* and mesophilic aerobic were also carried out. These samples were collected with the aid of sterile swabs. Our results showed that 97% of analyzed food are within established limits, 6.6% of the samples showed the presence of fecal coliform, and 3.3% of the samples showed the presence of *E.coli*. As for coagulase positive *Staphylococcus*, 3.3% of the samples contained this type of micro-organism, but in low count, being within the permitted limits. The analysis of surfaces, utensils and hands of the handlers showed fecal coliform <3 MPN / g, 61% of the samples showed the presence of coagulase positive *Staphylococcus* and for mesophilic aerobic 100% of the samples had higher numbers than those established by the American Association of Public Health (APHA). With the results presented in this study, the need to improve the hygienic-sanitary conditions of the environment of food preparation and also of the food handlers is evident.

Keywords: Food poisoning, food security e contaminated food

1.INTRODUÇÃO

Historicamente, Mazzilli (1987) considera que, no Brasil, a alimentação escolar teve iniciativa das próprias comunidades, era preparada nas residências e logo após levada até as escolas para serem servidas aos alunos. Isto ocorreu até meados da década de 1950 e após isso foi assumido pelo Estado, tendo esse direito garantido na Constituição Federal de 1988 .

Nas creches municipais são atendidas crianças de 4 meses até 5 anos de idade, sendo considerado grupo de risco devido a imaturidade do sistema imunológico e do aparelho digestório. Os surtos alimentares podem ocorrer nessas instituições, principalmente se ocorrerem falhas na refrigeração e no preparo do alimento, tendo um tempo longo de espera até ser consumido, ou ainda por falha do processo de cocção.

Os alimentos servidos nas creches precisam ser seguros, ou seja, que não ofereçam riscos em seu consumo. Desta forma é necessário seguir as normas de preparo dos alimentos, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada, onde alimentos cozidos são manipulados em superfícies ou com utensílios contaminados, podendo ocorrer ainda à contaminação proveniente dos manipuladores dos alimentos.

Doença transmitida por alimento (DTA) ocorre quando algum indivíduo consome algum alimento contaminado por micro-organismos e/ou suas toxinas e em decorrência deste consumo vem a apresentar algum sintoma como náuseas, vômitos, diarréia, dor abdominal, febre etc... As DTAs podem desencadear quadro clínico leve, moderado e severo, podendo causar até mesmo a morte.

Muitos casos de surtos alimentares têm sido relatados por diversos pesquisadores, mostrando - se um problema de saúde pública, tendo um impacto muito grande na economia, pois os indivíduos acometidos acabam não comparecendo ao trabalho e procuram os serviços de saúde, gerando um gasto ainda maior.

O treinamento de manipuladores é um ponto importante para reduzir a ocorrência de surto alimentar, devendo ser realizado periodicamente, abordando os pontos vulneráveis no processo de elaboração da alimentação escolar, desta forma procurando obter a garantia da qualidade higiênica sanitária das refeições servidas nas creches.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da merenda escolar

Segundo MAZZILLI (1987), no Brasil a assistência alimentar nas escolas foi iniciada pela própria comunidade: o alimento era preparado nas residências e transportado até as escolas. Isso ocorreu até meados dos anos 1950. Também na década de 1950 nascia o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), que é financiado pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE). Com a promulgação da Constituição Federal de 1988, ficou assegurado ao aluno do Ensino Fundamental público o direito à alimentação escolar, sendo desta forma obrigação do Estado o cumprimento deste direito (BRASIL, 2012a).

Em 2010, no Brasil, foram gastos 3,034 bilhões de reais em alimentação escolar, isso mostra a dimensão dos valores que são aplicados nesta área. A Tabela 1 apresenta a evolução destes gastos durante o período de 1995 a 2010 (BRASIL, 2012b).

TABELA. 1 – Gastos com alimentação escolar durante o período de 1995 a 2010 (BRASIL, 2012b).

Ano	Recursos financeiros (em milhões de R\$)	Alunos atendidos (em milhões)
1995	590,1	33,2
1996	454,1	30,5
1997	672,8	35,1
1998	785,3	35,3
1999	871,7	36,9
2000	901,7	37,1
2001	920,2	37,1
2002	848,6	36,9
2003	954,2	37,3
2004	1.025	37,8
2005	1.266	36,4
2006	1.500	36,3
2007	1.520	35,7
2008	1.490	34,6
2009	2.013	47
2010	3.034	45,6

Desta forma, hoje há mais de 45 milhões de estudantes matriculados no Ensino Fundamental público no Brasil e estes consomem, diariamente, alimentos que são servidos nessas escolas. Conforme a Resolução nº 38 de 16/7/2009 do Ministério da Educação, seu primeiro princípio do artigo 3º visa a segurança alimentar e nutricional dos alunos, ou seja, os alunos têm o direito garantido no consumo de alimentos que não ofereçam riscos à sua saúde (BRASIL, 2009a).

“3º. São diretrizes do Programa Nacional de Alimentação Escolar:
I – O emprego da alimentação saudável e adequada, que compreende o uso de alimentos variados, seguros, que respeitem a cultura e as tradições alimentares, contribuindo para o crescimento desenvolvimento dos alunos em conformidade com a faixa etária, sexo e atividade física e o estado de saúde dos mesmos, inclusive os que necessitam de atenção específica” (BRASIL, 2009a).

2.2 Segurança Alimentar e Nutricional

O termo "Segurança Alimentar" surgiu no final da Primeira Guerra Mundial, em decorrência da preocupação de que um país poderia dominar outro se tivesse o controle sobre seu fornecimento de alimentos (PIRAGINE, K. O., 2005).

O conceito de segurança alimentar e nutricional sofreu até o momento mudanças em sua definição. Anteriormente, a segurança alimentar tinha questões referentes ao abastecimento e acesso aos alimentos em quantidades adequadas, não levando em consideração outras questões igualmente importantes (FREITAS ; PENA, 2007)

No Brasil foi criado o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (SISAN) em 15 de setembro de 2006 através da Lei de Nº 11.346, o qual traz uma definição de Segurança Alimentar que abrange também a garantia da qualidade sanitária dos alimentos e o uso sustentável dos recursos naturais (BRASIL, 2006):

“A segurança alimentar e nutricional consiste na realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de

saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis”.

A qualidade dos alimentos que integrarão o cardápio nas escolas compreende vários focos, dentre eles o aspecto higiênico-sanitário – características microbiológicas, microscópicas e toxicológicas, que devem ser apropriadas para garantir que as crianças não corram nenhum risco de agravo à saúde ao consumir os alimentos (PEDRAZA e ANDRADE, 2006).

TABELA 2. Legislações relacionadas à Segurança de Alimentos no Brasil

Legislação	Abordagens
APPCC- Análise de perigos em Pontos Críticos de Controle	
Portaria n- 1428, de 26 de novembro de 1993 – MS	Aprova o regulamento técnico para a inspeção sanitária de alimentos – APCC
BPF – Boas Práticas de Fabricação	
Portaria n-1428, de 26 de novembro de 1993 – MS	Estabelece as Diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de produção e de prestação de Serviços na área de alimentos
Portaria n- 326, de 30 de julho de 1997- MS	Aprova o regulamento técnico sobre Condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos
Resolução – RDC n- 275, de 21 de outubro de 2002 – ANVISA	Estabelece a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimento Produtores/Industrializadores de Alimentos
Resolução – RDC n – 216 de 15 de setembro de 2004 – MS	Estabelece procedimentos de Boas Práticas para serviços de alimentação
Padrões Microbiológicos Para Alimentos	
Resolução – RDC n- 12, de 02 de janeiro de 2001	Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano.

Fonte: RODRIGUES, 2007

A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é um sistema preventivo de controle de qualidade reconhecido mundialmente, utilizado na área de alimentos para o gerenciamento da segurança e da qualidade dos produtos alimentícios.

O APPCC visa a obtenção de alimentos seguros com análise de pontos críticos de controle, este sistema constitui um método embasado na aplicação de princípios técnicos e científicos de caráter preventivo, aplicável em toda cadeia alimentar, sendo, portanto, realizadas análises da produção do campo à mesa, desde o plantio à colheita, processamento, até a comercialização e/ou uso de um determinado produto alimentício (ABERC, 2003)

Em 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 275, que apresenta os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) e a Lista de Verificação do Cumprimento das Boas Práticas para os Estabelecimentos Industriais de Alimentos. Essa resolução veio complementar a Portaria n° 326 de 1997/Secretaria de Vigilância Sanitária, que aprovou o regulamento técnico sobre Condições Higiênico-sanitárias e Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos (ALMEIDA-MURIDIAN *et al.*, 2007).

Em 2004, foi criada a Resolução - RDC n° 216, 15 de setembro de 2004 que dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Desta forma esse documento descreve as operações realizadas pelos estabelecimentos, incluindo no mínimo os requisitos higiênico-sanitários dos edifícios, a manutenção e higienização das instalações, dos equipamentos e dos utensílios, o controle da água de abastecimento, o controle integrado de vetores e pragas urbanas, a capacitação profissional, o controle da higiene e saúde dos manipuladores, o manejo de resíduos e o controle e garantia de qualidade do alimento preparado, estabelecendo, assim, critérios para garantir um alimento mais seguro (BRASIL, 2004b; CODEX, 2003).

Devido à necessidade de estabelecer critérios e padrões microbiológicos para alimentos, foi criada a Resolução - RDC N° 12 de Janeiro de 2001 (anexo I). Essa RDC estabelece as análises que são necessárias para garantir a qualidade microbiológica do alimento de acordo com sua natureza. Essa RDC informa quais micro-organismos devem ser analisados em cada alimento, indicando a contagem limite para cada micro-organismo e a amostragem que deve ser realizada (BRASIL, 2001).

2.3 Alimento Seguro

Para PANETTA (1999) alimento seguro é o que não causa danos à saúde do consumidor, não lhe tira o prazer e nem lhe rouba a alegria de se alimentar correta e seguramente; além disso, apresenta as propriedades nutricionais esperadas.

Segundo FRANCO e LANGRAF (2005), para o alimento ser considerado seguro, os constituintes ou contaminantes que causam perigo à saúde devem estar ausentes ou em uma concentração que não cause dano algum.

Por outro lado, considerar um alimento seguro igual a risco zero é impraticável dada a complexidade da cadeia de distribuição e a natureza humana. Desta forma a produção de alimentos seguros é de responsabilidade de todos na cadeia de produção alimentar, desde o operário do transporte até os mais altos executivos (FORSYTHE, 2002).

Entre os três tipos de riscos associado ao consumo de alimentos, o risco biológico é o que representa maior risco à inocuidade dos alimentos, e neste grupo incluem-se bactérias, fungos, vírus, parasitas patogênicos e toxinas microbianas (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

O alimento é caracterizado como veículo dos agentes etiológicos causadores das enfermidades e pode sofrer contaminação em qualquer ponto da cadeia alimentar (Figura 1), (CARMO *et al.* 2005).

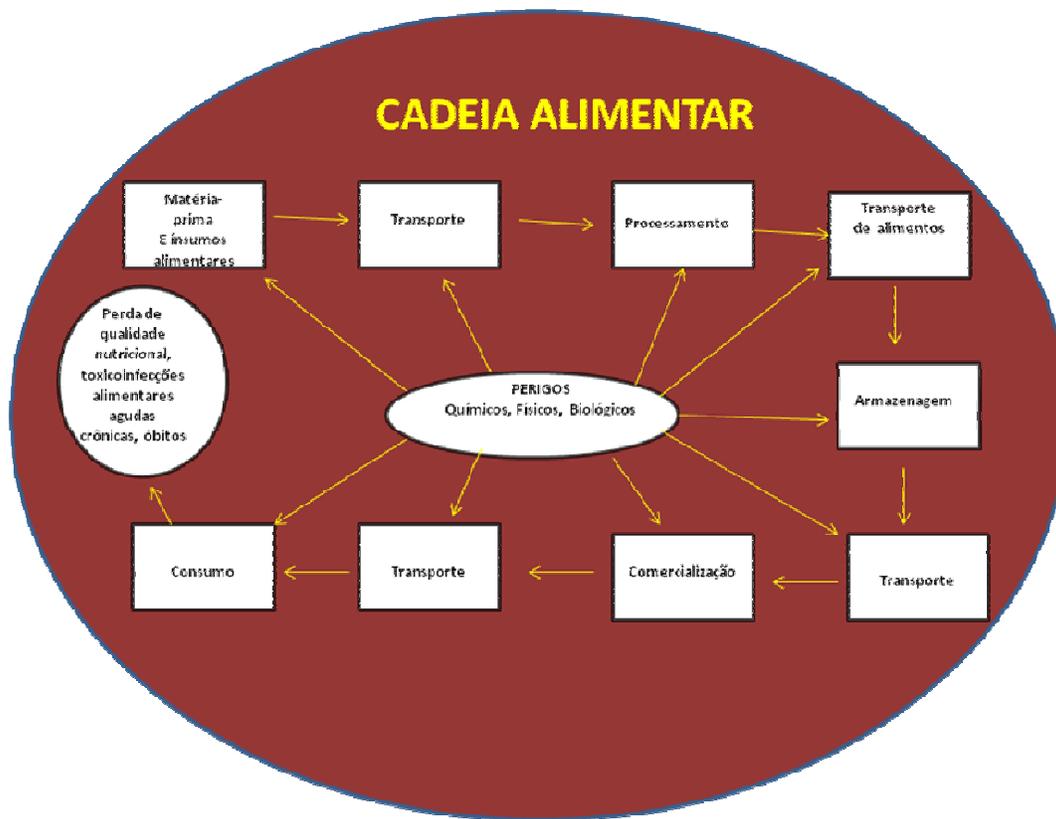


FIGURA 1. Contaminação dos alimentos na cadeia alimentar.

Fonte: CARMO *et al* 2005

A inocuidade dos alimentos fornecidos em escolas brasileiras deve ser inserida como prioridade na agenda da saúde pública com destaque específico para crianças e jovens, considerados grupos de maior risco, sendo determinada pela Portaria Interministerial nº 1010, de 8 de maio de 2006 (BRASIL, 2006b).

2.4 Doença Transmitida por Alimento

Doença transmitida por alimento é um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarréia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados. Também podem ser afetados outros sistemas como: meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido (BRASIL, 2010).

Dependendo do agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser extremamente sério, com desidratação grave, diarréia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência

respiratória. Entre as causas mais frequentes de contaminação dos alimentos, destacam-se a manipulação e a conservação inadequadas dos mesmos, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados (FORSYTHE 2002, CARMO *et al.* 2005, MÜRMAN *et al.* 2008).

Existem vários mecanismos patogênicos envolvidos com a determinação das DTA, de forma simplificada, pode-se agrupar as DTA nas seguintes categorias:

Infecções – são causadas pela ingestão de micro-organismos patogênicos, denominados invasivos, com capacidade de penetrar e invadir tecidos, originando quadro clínico característico, estes quadros geralmente são associados a diarréias frequentes, mas não volumosas, contendo sangue e pus, dores abdominais intensas, febre e desidratação leve, sugerindo infecção do intestino grosso por bactérias invasivas.

Toxinfecções – são causadas por micro-organismos toxigênicos, cujo quadro clínico e provocado por toxinas liberadas quando estes se multiplicam, esporulam ou sofrem lise na luz intestinal, essas toxinas atuam nos mecanismos de secreção/absorção da mucosa do intestino.

Intoxicações – são provocadas pela ingestão de toxinas formadas em decorrência da intensa proliferação do micro-organismo patogênico no alimento. Os mecanismos de ação dessas toxinas em humanos não estão bem esclarecidos. Observações em animais sugerem alterações na permeabilidade vascular e inibição da absorção de água e sódio levando as diarréias (BRASIL, 2010).

A alimentação dentro de padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e a manutenção da saúde, sendo que a deficiência nesse controle é um dos fatores responsáveis pela ocorrência de surtos de origem alimentares. Um surto alimentar ocorre quando duas ou mais pessoas que consumiram o mesmo alimento contaminado vem a ter a mesma doença (OLIVEIRA *et al.*, 2002, CDC, 2011b).

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante a qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010).

A preparação da merenda escolar em escala implica em riscos para os estudantes, professores e funcionários em geral, sendo de grande importância a utilização de medidas profiláticas para a diminuição deste problema, através dos aspectos higiênico-sanitários no preparo do alimento, treinamento de pessoal e a informação da educação sanitária (FORTUNA, 2002).

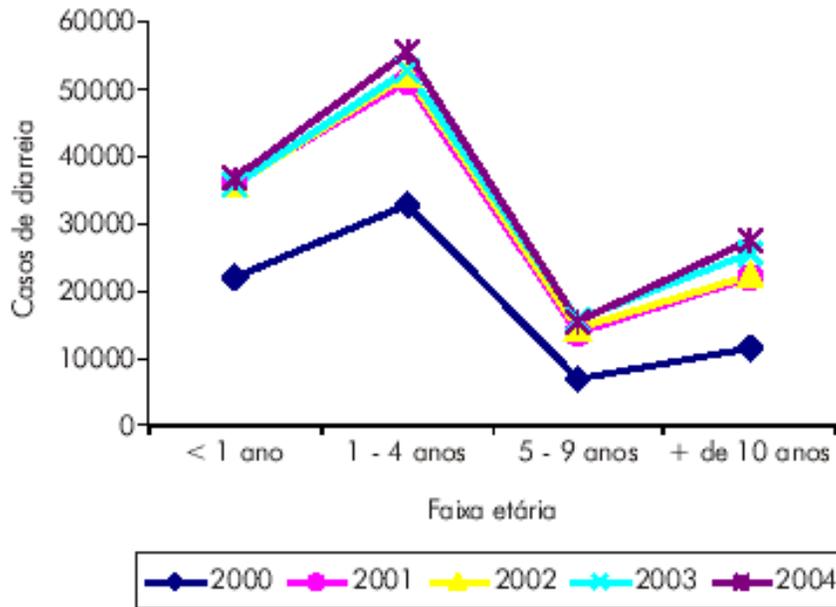
São conhecidos como mais suscetíveis a contrair DTA ou como população de risco mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças, idosos e imunocomprometidos (LITTLE *et al.*, 2012).

Sabe-se que um organismo debilitado é muito mais vulnerável aos ataques dos micro-organismos. Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS), denuncia casos de patologia infantil estreitamente associado à subalimentação. Alguns momentos e situações da vida escolar merecem destaque, como as atividades realizadas no período da produção e distribuição das refeições, na cozinha e no refeitório, tendo a escola uma unidade de alimentação própria, ou trabalhando com fornecedores terceirizados (BRASIL, 2004b).

A OMS (2010), estima que as doenças diarreicas matam cerca de 2,2 milhões de pessoas anualmente; sendo 1,9 milhões, crianças com menos de cinco anos de idade .

Na África, estima-se que 800.000 crianças morrem a cada ano de diarreia e desidratação, sendo 70% dos casos provavelmente causados por alimentos contaminados (HAEN, 2005).

De acordo com investigação realizada por DIAS (2010), mostra que a maior taxa de incidência de diarreia aguda foi encontrada na faixa etária de 1 - 4 anos, comprovando a vulnerabilidade de crianças menores de 4 anos de idade. (Figura 2)



Fonte: DIAS, 2010

FIGURA 2. Número de casos de diarreia por faixa etária, Pará 2000- 2004

Estima-se que o custo das DTA nos Estados Unidos da America (EUA) é de 5 a 6 bilhões de dólares em gastos diretos e perda de produtividade por ano. Infecções somente pela bactéria *Salmonella* spp implicam perda de \$ 1,0 bilhão de dólares em custos diretos e indiretos (SCHRAFF, 2010 ; CARMO *et al.* 2005).

Segundo TAITT & SHUBIN (2004), os custos estimados da alta incidência da Samonelose nos Estados Unidos variaram entre \$ 1,3 a \$ 4,0 bilhões de dólares por ano, em decorrência de despesas médicas, ausência ao trabalho e quebras na produtividade.

Nos Estados Unidos, as estimativas de doenças de origem alimentar relacionadas foram 48 milhões de casos, 128.000 hospitalizações e 3.000 mortes, anualmente (CDC 2011).

Na França, estima-se que as doenças veiculadas por alimentos resultem entre em 10.000 e 18.000 hospitalizações por ano, onde dessas, a maioria tem como causa principal *Salmonella* spp. Na Inglaterra e no País de Gales, entre os anos de 1999 e 2000, as DTA resultaram em 21.997 internações e 687 óbitos (BARBOSA *et. al.*, 2009).

O surto que, aparentemente se iniciou na Alemanha, se espalhou rapidamente pelos países do continente europeu e se manifestava na forma de Infecção enterohemorrágica causado por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que em muitos casos evoluiu para casos de Síndrome Urêmica

Hemolítica (SUH). Na última atualização divulgada pela Organização Mundial de Saúde (07/2011), 16 países da Europa e América do Norte haviam relatado casos do surto que totalizaram 3.167 casos de EHEC com 16 casos de óbito e 908 casos de SUH sendo que desses 35 resultaram em óbito. Após investigação epidemiológica o alimento identificado como veiculador do surto foi o broto de feijão que normalmente é consumido cru (WHO, 2011).

No Brasil os custos com os casos de internações por DTA de 1999 a 2004, chegam a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO *et al.* 2005).

Análise Epidemiológica dos Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil de 2000 a 2011 mostra que ocorreram 8.663 surtos de DTA (Figura 3) envolvendo 163.425 doentes e 112 óbitos (BRASIL, 2012c).



FIGURA 3. Surtos e casos de DTA no Brasil ocorridos entre 2000 a 2011

Fonte: BRASIL, 2012c

No Brasil, entre os anos 1999 a 2009, as bactérias foram identificadas como o agente etiológico responsável de 41,1% dos surtos, enquanto que os vírus foram implicados em 6,4% do total de casos (BRASIL, 2009b).

Em São Paulo, dentre os surtos alimentares notificados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), no período de 1999 a 2008, 62% foram causados por bactérias, 25% por vírus e 10% por parasitas (SÃO PAULO, 2008).

Os agentes etiológicos bacterianos mais frequentes nos surtos no Brasil (Figura 4) foram: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (BRASIL 2012c).

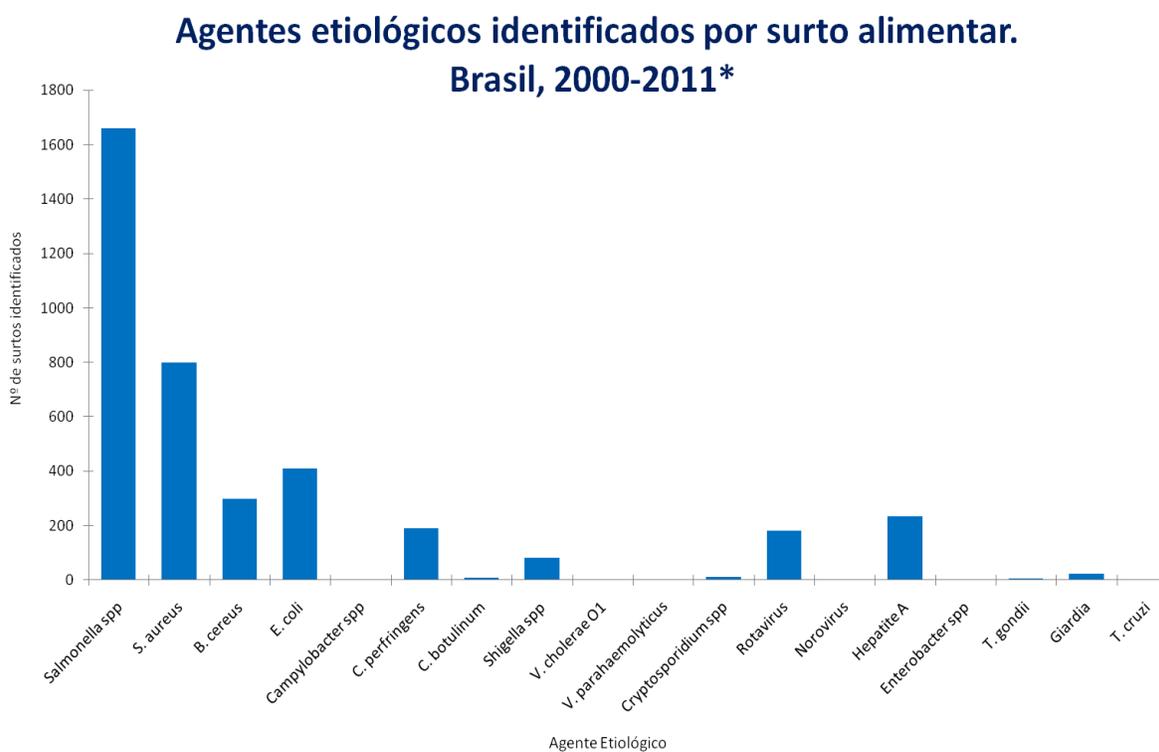


FIGURA 4. Agentes etiológicos identificados por surto alimentar Brasil, 2000-2011.

Fonte: BRASIL, 2012c

Os locais de maior ocorrência de DTA no Brasil estão demonstrados na Figura 5, onde observa-se que as creches/escolas encontram-se em terceiro lugar (BRASIL, 2012c). De acordo com análise dos surtos de DTA ocorridos no Estado de São Paulo de 1995- 2008 (Figura 6), confirma-se as creches/escolas em terceiro local de ocorrência de DTA (MAYER, 2009).

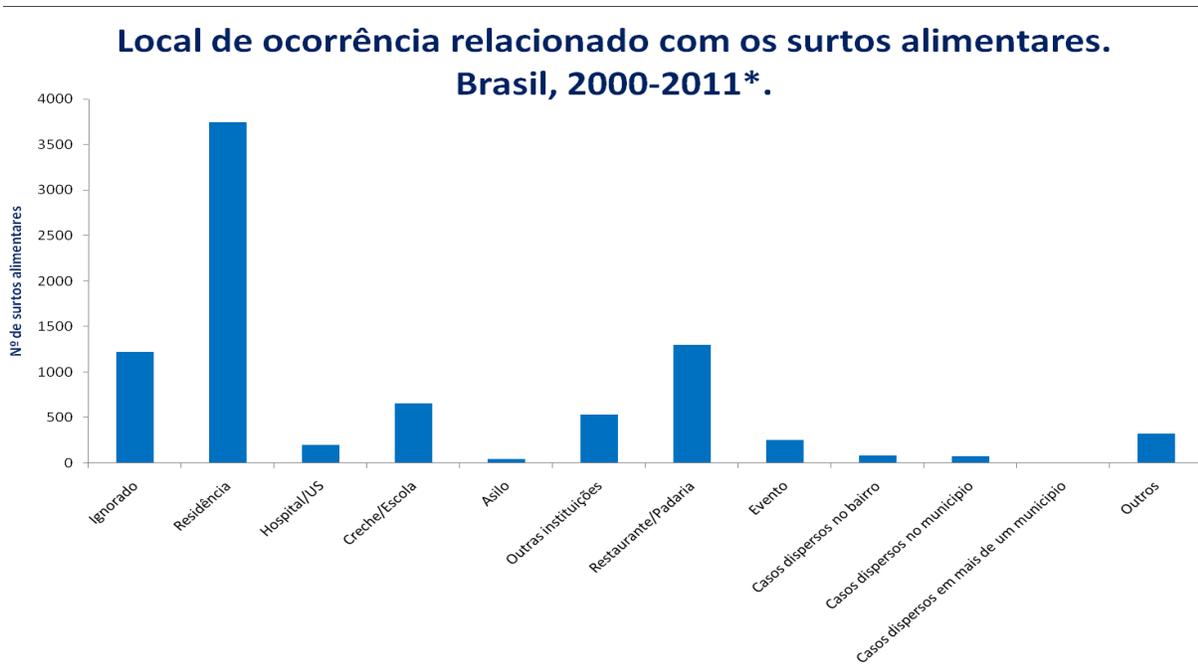


FIGURA 5. Locais de ocorrências relacionado com o surto de DTA, Brasil 2000 a 2011.

Fonte: BRASIL, 2012c

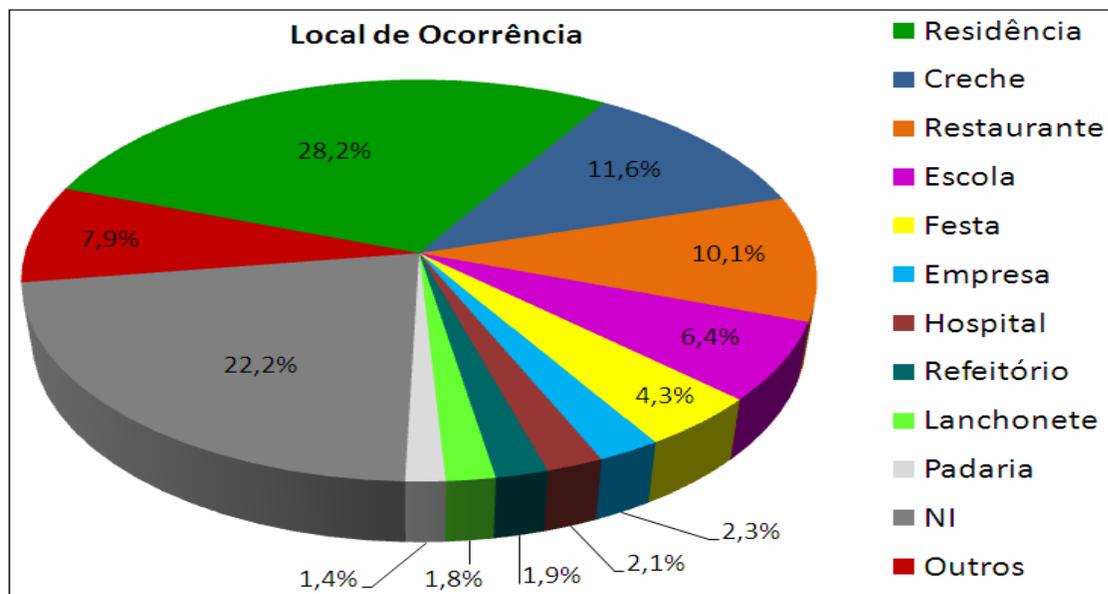


FIGURA 6. Porcentagem de surtos notificados de DTAs no Estado de São Paulo entre 1999 -2008 segundo o local de ocorrência.

Fonte: MAYER, 2009

Embora a ocorrência de DTA seja comum, acredita-se que os registros sejam subnotificados, pois muitos dos patógenos alimentares causam sintomas parecidos com gripes, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico. Estudo realizado na Inglaterra, em 1999, estima que para cada caso notificado existam mais 136 casos não notificados. Nesse caso, o número de casos notificados estão longe de serem os reais (FORSYTHE 2002).

No Brasil, a situação é ainda mais crítica, uma vez que a notificação de doenças transmitidas por alimentos é uma exceção, compromete a avaliação de um problema que afeta toda a sua população, com mais intensidade na camada menos favorecida (LUCCA & TORRES, 2002).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2010).

O serviço de vigilância do Brasil divulgou dados sobre surtos alimentares, de maneira estratificada e por região, compreendendo o período de 2007 a 2010. Para tanto, classificaram casos associados à Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA), que tem por objetivo a detecção de alterações no padrão local das doenças diarreicas, que podem ser interpretadas como casos de surtos e epidemias, permitindo a implantação em tempo hábil de ações corretivas e preventivas para as não conformidades e ao Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN). O SINAN é um sistema de base de dados informatizado, gerenciado pelo Ministério da Saúde e tem como fonte as informações coletadas nas unidades de saúde, que são transferidas para as esferas municipais, estaduais e federal. Quando confronta-se as informações dos dois sistemas percebe-se que no Brasil, além da sub notificação, existe a discrepância entre as informações nos sistemas. No período de 2007 a 2010 a diferença entre órgãos de notificação foi de mais de 73%, conforme dados da Tabela 3 (OLIVEIRA, 2012 ; SES/SP, 2008; BRASIL, 2012c)

TABELA - 3: Comparativo dos registros computados por MDDA e SINAN-net. Regiões, Brasil, 2007-2010

Total de casos por região do Brasil 2007-2010		
	MDDA	SINAN
Norte	770 casos	213 casos
Nordeste	3.448 casos	509 casos
Centro-Oeste	3152 casos	169 casos
Sudeste	2648 casos	1372 casos
Sul	4041 casos	1407 casos
Total	14.059	3670 casos

Fonte: OLIVEIRA, 2012

Segundo VICO e LAURENTI (2004) vários estudos têm demonstrado que a frequência à creche é fator de risco, aumentando a exposição e transmissão de agentes que causam agravos à saúde.

As práticas alimentares e hábitos saudáveis são construídos pelos indivíduos nas relações sociais que estabelecem em diferentes espaços de convivência e troca de informação. Na infância e adolescência, além da família, que é o núcleo privilegiado para a estruturação do comportamento, o ambiente escolar é um espaço extremamente significativo de socialização e, portanto, de promoção de práticas alimentares saudáveis (BRASIL, 2004a).

Creches e escolas são espaços privilegiados para ampliar o acesso à informação sobre saúde e nutrição, bem como para a construção de habilidades e competências fundamentais, como autonomia e capacidade decisória, decisivas para que as crianças tenham bons relacionamentos em grupo, saibam administrar situações de conflitos, desenvolvam o raciocínio lógico, o pensamento crítico e criativo, etc. Alguns momentos e situações da vida escolar merecem destaque, como as atividades realizadas no período da produção e distribuição das refeições, na cozinha e no refeitório, tendo a escola uma unidade de alimentação própria, ou trabalhando com fornecedores terceirizados (BRASIL, 2004a).

2.5 Principais características dos agentes etiológico de surtos com DTAs no Brasil

2.5.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Samonella* é considerado por muitos autores como um dos patógenos mais importantes causadores de surtos de infecções alimentares em todo o mundo. Seu estudo tem grande importância para a saúde coletiva pelo fato de causar uma enfermidade de difícil controle, em virtude de se apresentar distribuído amplamente na natureza, possuir uma grande variedade de reservatórios, ser extremamente patogênico para o homem e para muitas espécies animais e ter sua disseminação favorecida por indivíduos portadores assintomáticos (BERSOT, 2006).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e as bactérias pertencentes a este grupo apresentam morfologia de bastonete reto; Gram negativo; ausência de esporos; anaeróbia facultativa; geralmente móveis por flagelos peritríquios; seu metabolismo da glicose e de outros carboidratos resulta na produção de ácido e geralmente gás. As salmonelas não produzem oxidases, e indol, não hidrolisam ureia, são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono e produzem catalase (D'AOUST E MAURER, 2007; FORSYTHE 2002).

As *Salmonellas* são mesófilas, sendo 35°C a 40°C a temperatura ótima para o seu crescimento, porém alguns subtipos são capazes de crescer em temperaturas mais elevadas (≤ 54 °C) e outras têm propriedade psicrotróficas, podendo crescer sob refrigeração de 2 °C a 4 °C. São destruídas pelo aquecimento a 60 °C, por 15-20 minutos. Já o congelamento apenas provoca uma redução do número de células viáveis, mas não a destruição completa. O pH ótimo de crescimento está entre 6,5 e 7,5 (D'AOUST & MAURER, 2007; FERREIRA & CAMPOS, 2008; BAILEY *et al.*, 2010).

A atividade de água (A_w) mínima é torno de 0,94; porém, podem sobreviver em alimentos com A_w baixa, como gelatina em pó e pimenta do reino (GERMANO & GERMANO, 2003).

O gênero *Salmonella* contém muitos sorovares, de acordo com os antígenos somático (O) flagelar (H) e capsular (Vi) presentes. São conhecidos hoje 2450 sorovares diferentes (FERREIRA & CAMPOS, 2008; BAILEY *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade de indivíduos em surtos com *Salmonella* são geralmente menor que 1%, porém, com a espécie *S. enteritidis* tem uma taxa de mortalidade de 3,6%, principalmente em surtos em casas de repouso e hospitais, com os idosos sendo particularmente afetados (FDA, 2007).

De acordo com FORSYTHE (2002) e LOPES (2011), o gênero *Salmonella* pode provocar basicamente três tipos de doença:

1. **Febre tifóide:** Causada por *S. typhi*, sendo transmitida por água e alimentos contaminados. Os sintomas aparecem em até 14 dias após a ingestão do patógeno e pode causar septicemia, febre alta, diarreia, vômitos, letargia, dor abdominal, cefaleia e erupções cutâneas, com uma letalidade em torno de 10%. Alguns indivíduos podem ficar excretando a bactéria durante meses.

2. **Febre paratifóide:** causada por *S. paratyphi* A e C. Semelhante a febre tifóide, mas com sintomas amenos: febre vômitos e diarreia, a doença pode durar até três semanas.

3. **Salmonelose:** representa a forma clínica mais comum e tem como agente etiológico os sorovares não tifoïdes. Os sintomas aparecem em 12 a 36 horas após o consumo do alimento contaminado, levando a um quadro de diarreia, vômitos, febre, dor abdominal e calafrios. Em alguns casos, são necessários cuidados hospitalares e também podem surgir complicações crônicas como artrites e síndrome de Reiter (FORSYTHE 2002; LOPES, 2011).

2.5.2 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: *Staphylococcaceae*. Esta família consta dos gêneros *Staphylococcus*, *Gamela*, *Macroccoccus* e *Salicinococcus* (GARRITY e HOLT, 2001).

Staphylococcus spp. são bactérias do tipo cocos, Gram positivas, imóveis e não formadoras de esporos. O metabolismo dessas espécies é bastante diversificado: podem realizar respiração aeróbica, anaeróbica e fermentação de carboidratos. São catalase positiva (exceção para *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*) e oxidase negativa (exceto *S. caseolyticus*, *S. lentus* e *S. sciuri*) (HOLT *et al.*, 1994).

São classificados como micro-organismos mesófilos, podendo apresentar crescimento entre 10 e 46°C, sendo a faixa de temperatura ótima de crescimento de 30-37 °C. pH ótimo de crescimento fica perto da neutralidade (6,0 e 7,0), podendo ocorrer crescimento entre valores de pH 4,0 e 9,8. Em relação a A_a , considera-se um valor mínimo de 0,86, mas há registros de crescimento com valores inferiores a 0,83 (JAY,2005).

O habitat natural dos *Staphylococcus* spp. são os animais, onde no homem, podem estar presentes em diferentes partes do corpo, como no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato

gastrointestinal, na superfície da pele, sendo mais frequentes nas mãos, braços, rostos e feridas (CASTRO *et al*, 1984; RAPINI *et al.*, 2005), em indivíduos saudáveis a pele pode ser colonizada por oito a dez espécies de *Staphylococcus* spp. (SANTOS *et al*, 2007).

O gênero *Staphylococcus* encontra-se dividido em dois grupos: os estafilococos coagulase negativos, que estão subdivididos em mais de 10 espécies; e os estafilococos coagulase positivos, que foram subdivididos em 4 espécies, sendo o *S. aureus* um dos principais representantes deste grupo, devido a sua patogenicidade (CARMO, 2002).

Morte de intoxicação alimentar estafilocócica é incomum, embora tenha ocorrido entre os idosos, crianças e pessoas gravemente debilitadas (FDA, 2007).

Na ocorrência de DTA por *Staphylococcus* coagulase positiva, esta associa-se aos manipuladores de alimentos, realizando a contaminação do alimento através do contato direto (MICHELIN *et al*, 2006).

2.5.3 *Bacillus cereus*

A bactéria *B. cereus* é um bastonete Gram positivo, aeróbio facultativo, móvel através de flagelos peritríquios, produtor de exo-enterotoxinas e formador de esporo que lhe confere resistência ao calor, ao processo de desidratação e aos agentes químicos, como os desinfetantes. Esse microrganismo pode se multiplicar numa faixa de pH entre 4,3-9,3.

A maioria das cepas é mesófila, com uma temperatura ótima de crescimento entre 25-37°C; porém, algumas cepas apresentam características psicrotóficas, podendo se desenvolver em alimentos refrigerados em temperaturas ao redor de 4°C. Por outro lado, os esporos podem sobreviver a muitos processos de cocção (SCHOENI & WONG, 2005; FORSYTHE, 2002).

O *Bacillu cereus* é encontrado por toda natureza sendo isolado do solo, vegetais, água fresca e dos pelos de animais. Também é isolado a partir de alimentos crus e processados, como arroz, condimentos, vegetais, preparações cárneas e laticínios (KRAMER & GILBERT, 1989; FORSYTHE, 2002).

Amplamente distribuída na natureza, essa bactéria está relacionada a surtos de DTAs como causadoras de dois tipos de enfermidades, provocadas por diferentes toxinas: síndrome diarreica e síndrome emética.

A síndrome diarreica é causada por proteínas de elevado peso molecular, sensíveis a pH inferior a 4,0 e termosensíveis, podendo ser inativadas se submetidas a 55°C durante 20 minutos. É causada pela ingestão de grande número de células ou da toxina já produzida no alimento durante a fase exponencial de crescimento do *B. cereus*. O período de incubação da doença varia de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e os principais sintomas são: diarreia intensa, dores abdominais e tenesmos retais. Os alimentos mais relacionados com essa síndrome são vegetais crus e cozidos, produtos cárneos, pescado, massas, leite, sorvetes, pudins a base de amido, entre outros (FRANCO e LANDGRAF, 2003; FORSYTHE, 2002).

A síndrome emética esta intoxicação é caracterizada por náuseas e vômitos durante um período de 30 minutos até 6 horas após o consumo de alimentos contaminados, podendo ocorrer com menos frequência dor abdominal; esta toxina é termoestável (90 min. a 126 °C). Como o micro-organismo se encontra em todo ambiente, o melhor meio do controle é a prevenção da germinação de esporos e a multiplicação em alimentos cozidos prontos para consumo (FORSYTHE, 2002).

2.5.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) normalmente vive nos intestinos de pessoas e animais. A maioria das *E. coli* é inofensiva e, na verdade, é um micro-organismo importante do trato intestinal humano saudável. No entanto, algumas *E. coli* são patogênicas, o que significa que eles podem causar a doença, ou diarreia ou doença fora do trato intestinal. Os tipos de *E. coli* que pode causar diarreia pode ser transmitida através de água ou alimentos contaminados, ou ainda pelo contato com animais ou pessoas (CDC 2012).

Pertencem à família *Enterobacteriaceae* e, como tal, são anaeróbias facultativas, fermentam a glicose, são citocromo oxidase negativos, reduzem nitrato a nitrito e não esporulam. *E. coli* é classificada, sorologicamente, em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos O ou somáticos para os sorogrupos, e antígenos flagelares ou H para os sorotipos. Ela pode, ainda, expressar antígenos K ou capsulares, importantes na patogênese (CAMPOS *et al.*, 2004; NATARO *et.al.*, 2011)

Existem pelo menos cinco categorias de *E. coli*: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli*

produtora de toxina Shiga ou *E. coli* enterohemorrágica (STEC/EHEC). (NATARO; KAPER, 1998).

Essas espécies de bactérias estão relacionadas a um amplo espectro de doenças humanas, que compreende desde diarreias leves à colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica e a púrpura trombocitopênica trombótica, em seres humanos (BERTÃO, 2007).

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é a principal causa de diarreia em crianças em países em desenvolvimento. Já nos países desenvolvidos, a frequência destes organismos diminuiu, porém continua sendo importante causa de diarreia. O mecanismo de patogenicidade da EPEC se caracteriza pela destruição das microvilosidades intestinais e adesão da bactéria ao epitélio intestinal, causando quadros importantes de diarreias (TRABULSI & KELLER, 2002)

2.5.5 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens é um bastonete anaeróbico, Gram positivo, formador de esporos. Consiste em um grupo de bactérias anaeróbias obrigatórias e extremamente patogênicas ao homem e animais. É classificado em cinco tipos (A, B, C, D e E), baseados na produção de uma ou mais toxinas. Os esporos do micro-organismo sobrevivem no solo, sedimentos e em áreas sujeitas à poluição fecal de humanos e animais (FORSYTHE, 2002; COSTA, 2012).

Clostridium perfringens é responsável por quadros clínicos de diarreias, enterotoxemia e gangrena gasosa. A patogenicidade está relacionada com as toxinas produzidas, estas podem causar um enterotoxemia fatal e grave. A taxa de mortalidade pode alcançar 100%, sendo que o surto dessa doença é de grande importância econômica. A exotoxina épsilon, produzida pelo *C.perfringens* tipos B e D, é uma das mais potentes toxinas de origem microbiana (SOUZA *et al.*, 2002 ; UZAL & SONGER 2008).

As características de DTA causadas por *C.perfringens* são: dor abdominal, náusea, diarreia aguda. Os sintomas aparecem 8 a 12 horas após a ingestão do micro-organismo. Um tipo mais sério e raro é causado pela ingestão de alimentos contaminados com linhagens do tipo C, conhecida como enterite necrótica (FORSYTHE, 2002).

Os alunos de uma escola pública na Inglaterra, em 1943, sofreram um surto de toxinfecção alimentar, através da ingestão de um frango pré-cozido contaminado, o que causou

uma gastroenterite severa. Somente após este episódio ele passou a ser considerado um micro-organismo transmitido por alimentos (BARRETO, 2000).

2.6 Fatores determinantes de surtos de DTA

Segundo o Manual Integrado de Vigilância (BRASIL, 2010), as ocorrências de surtos de DTA estão associadas à presença de alguns fatores de risco, que podem ser identificados na inspeção sanitária, e dentre os quais destacam-se:

- Falhas na cadeia de refrigeração de alimentos potencialmente perigosos;
- Conservação de alimentos mornos a temperatura ambiente (temperatura de incubação para os agentes bacterianos);
- Alimento preparado várias horas antes de seu consumo e cujo acondicionamento prévio ao consumo foi inadequado;
- Falhas no processo de cocção dos alimentos;
- Manipuladores de alimentos com práticas inadequadas de higiene pessoal ou portadores de lesões ou doenças;
- Utilização de matérias-primas contaminadas nas preparações alimentícias servidas cruas ou quando da ocorrência de mistura dessas com outros alimentos já cozidos;
- Alimentos preparados com matéria-prima contaminada que possibilite a introdução de micro-organismos no ambiente de preparo de alimentos, dando origem a possível ocorrência de contaminação cruzada;
- Falhas nos processos de higienização de utensílios e equipamentos utilizados no preparo de alimentos;
- Existência de condições ambientais favoráveis ao crescimento de agentes etiológicos seletos e inibidores de micro-organismos competidores;
- Alimentos obtidos de fontes não confiáveis;
- Práticas inadequadas de armazenamento.

2.7 Importância das condições higiênico-sanitárias nos locais de preparo dos alimentos

Os alimentos podem contaminar-se mediante o contato com utensílios, superfícies e equipamentos. São necessárias boas técnicas de limpeza, enxágue e desinfecção de superfícies e

utensílios. Para isso é essencial seguir rigorosamente os critérios dos Procedimentos Operacionais Padronizados, a fim de evitar a contaminação e proliferação de micro-organismos, entre eles, o grupo dos coliformes (ABERC, 2003).

As contagens de aeróbios mesófilos informam as condições higiênicas vigentes ao longo do processamento, tais como a higiene dos utensílios, dos equipamentos, das mãos, a qualidade do ar ambiente, das matérias-primas, bem como indicam condição inadequada de tempo-temperatura de armazenamento ou de processamento (RIBEIRO, 1998, SOUZA, 1997).

Sabe-se que, a manipulação dos alimentos quando não monitorada e vistoriada, pode comprometer a sanidade dos alimentos, causando intoxicações alimentares, colocando em dúvida todos os procedimentos realizados e expondo a possibilidade de fechamento do estabelecimento (SOUZA, 2006). No Brasil a Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, estipula uma série de situações nas quais os manipuladores dos alimentos devem observar:

- Presença de feridas: Ninguém que apresente feridas pode manipular alimentos ou superfícies que entrem em contato com alimentos.
- Enfermidades contagiosas: Ninguém que se saiba ou suspeite que esta doente ou é vetor de uma enfermidade suscetível de transmitir-se aos alimentos, ou que apresentem feridas infectadas, infecções cutâneas, chagas ou diarréias, trabalhar em qualquer área de manipulação de alimentos com micro-organismos patógenos, até que obtenha alta médica.
- Lavagem das mãos: Toda pessoa que trabalhe numa área de manipulação de alimentos deve, enquanto em serviço, lavar as mãos de maneira frequente e cuidadosa com um agente de limpeza autorizado e com água corrente potável fria ou fria e quente. Esta pessoa deve lavar as mãos antes do início dos trabalhos, imediatamente após o uso do sanitário, após a manipulação de material contaminado e todas as vezes que for necessário.
- Higiene pessoal: Toda pessoa que trabalhe em uma área de manipulação de alimentos deve manter uma higiene pessoal esmerada e deve usar roupa protetora, sapatos adequados, touca protetora. Todos estes elementos devem ser laváveis, a menos que sejam descartáveis e mantidos limpos, de acordo com a natureza do trabalho. Durante a manipulação de matérias-primas e alimentos, devem ser retirados todos os objetos de adorno pessoal.

A habilidade dos manipuladores de alimentos é imposta para impedir contaminações e naturalmente garantir a sanidade dos alimentos oferecidos. Com grande frequência deve-se estimular a educação sanitária dos manipuladores com ensinamento contínuo, e pondo em prática os conhecimentos adquiridos na teoria em sua jornada de trabalho, fortificando as boas práticas de fabricação e manipulação alimentar (PISTORE; GELINSKIB, 2006).

Os manipuladores são de extrema importância, pois são eles que lavam, descascam, cortam, ralam, manipulam, enfim, preparam o alimento. Segundo HAZELWOOD & MCLEAN (1994), para oferecer alimentos realmente seguros aos consumidores, todos os colaboradores envolvidos na produção e comercialização devem compreender da necessidade de trabalhar de modo seguro, a fim de garantir boas condições higiênicas para o produto final.

Segundo GERMANO & GERMANO (2003), um dos maiores problemas apresentados pelos estabelecimentos produtores de alimentos é a instalação física da cozinha, com um fluxo inapropriado para a manipulação correta de alimentos. Esta função geralmente é exercida por pessoas sem nenhuma qualificação profissional e habilidade suficiente para realizar todas as etapas de produção com o mínimo de higiene.

A legislação brasileira não estabelece padrão microbiológico para bactérias aeróbias mesófilas em superfícies de equipamentos, utensílios e mãos de manipuladores, porém podem refletir as condições higiênico-sanitárias do ambiente.

No presente estudo seguindo o padrão da Associação Americana de Saúde Pública (APHA), onde para superfícies com contagem de até 2 UFC/cm² para superfícies de bancadas e 100 UFC / utensílios ou área amostrada de equipamentos são consideradas satisfatórias, essa recomendação americana da APHA pode ser considerada rígida para os restaurantes brasileiros, em razão principalmente às condições de temperatura ambiental (EVANCHO, 2001)

2.7 Surto de DTAS em escolas e creches

Nas unidades escolares, os manipuladores são responsáveis por importantes etapas, passíveis de constituírem perigo para os comensais: recebimento das matérias-primas, reconstituição dos alimentos secos, preparação das refeições ou montagem dos pratos, controle do binômio tempo-temperatura de descongelamento, cocção e/ou reaquecimento, armazenamento de sobras e distribuição das refeições aos escolares nos horários de rotina do estabelecimento (GERMANO & GERMANO 2003).

Um estudo realizado nos Estados Unidos entre 1973 a 1997, mostra que 49.963 escolares foram acometidos por DTA, ocorrendo 1.514 internações e um óbito (DANIELS, *et al*, 2002).

No Japão entre 1987 a 1996, ocorreram 296 surtos de DTA associado à alimentação escolar e os fatores que mais contribuíram para os surtos foram: alimentos armazenados por longo tempo antes de serem servidos, contaminação cruzada, cozimento inadequado e funcionários infectados (MICHINO & OTSUKI, 2000).

Em Tenerife, Espanha, foi realizado um estudo onde, das 898 amostras de alimentos coletados em cantinas de 101 escolas, 24% apresentaram contaminação por *E. coli* (DIAZ *et al.*, 2003).

Foi relatado um surto de DTA causado por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) em escola de ensino médio em Copenhague, Dinamarca, que acometeram 200 alunos em novembro de 2006 (PAKALNISKIENE *et al.*, 2009).

Em duas escolas primárias em Yu-Li, Taiwan, 182 crianças foram acometidas em surtos de DTA causado por *Shigella sonnei* em 2001 (HUANG *ET AL.*, 2005).

Segundo GERMANO & GERMANO (2008), no Brasil entre 1999 e 2002, foram registrados 33 surtos em escolas, totalizando em 1371 enfermos, sendo 984 casos de origem bacteriana.

Um surto, em um município do Rio Grande do Sul, causou 594 casos (60,4%) de shigelose, sendo o sanduíche servido na merenda identificado como responsável pela DTA (GERMANO e GERMANO, 2008).

Diante deste panorama pode-se concluir que a contaminação de alimentos por micro-organismos (surtos de DTA) em escolas e creches, não é um problema apenas dos países em desenvolvimento e sim de todo o mundo.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- A pesquisa tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica da alimentação servida nas creches da rede pública de Campinas/SP por meio de investigação de microorganismos indicadores, confrontando os resultados obtidos nas análises com os limites estabelecidos pela ANVISA na RDC 12 de 2001.
- Avaliar a condições higiênicas sanitárias das superfícies de trabalho nas cozinhas, utensílios, e mãos dos manipuladores dos alimentos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença e contagem de coliformes termotolerantes pelo método NMP nos alimentos analisados de acordo com RDC 12 de 2001.
- Pesquisar a presença ou ausência de *Salmonella* nos alimentos analisados de acordo com RDC 12 de 2001
- Pesquisar a presença e contagem de *Bacillus cereus* nos alimentos analisados de acordo com RDC 12 de 2001.
- Pesquisar a presença e contagem *Staphylococcus* coagulase positiva nos alimentos analisados de acordo com RDC 12 de 2001.
- Pesquisar a presença e contagem de Clostrídios sulfito redutores a 46 °C nos alimentos de acordo com RDC 12 de 2001.
- Realizar a contagem total de mesófilos aeróbios nos alimentos analisados
- Realizar a contagem total de mesófilos aeróbios em superfícies, utensílios e mão de manipuladores.
- Pesquisar a presença e contagem *Staphylococcus* coagulase positiva em superfícies, utensílios e mãos de manipuladores.
- Pesquisar a presença e contagem de coliformes termotolerantes pelo método NMP em superfícies, utensílios e mão de manipuladores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em quatro creches da rede pública de Campinas/SP, com autorização prévia da Secretaria de Educação do Município. As creches foram escolhidas por sorteio com o auxílio da Coordenadoria de Vigilância em Saúde de Campinas, sendo uma de cada região de Campinas.

A pesquisa teve aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sendo que os manipuladores dos alimentos assinaram o Termo de Livre Esclarecimento (Anexo II).

4.1 AMOSTRAGEM

4.1.1 Amostragem dos alimentos prontos

Foram analisados alimentos prontos para o consumo servidos para crianças de 1 a 4 anos, sendo coletado todo o cardápio disponível no almoço. Dentre os alimentos analisados encontram-se diferentes grupos de alimentos, a saber: a base de cereais (Arroz, feijão), a base de carnes (carnes), a base de verduras e leguminosas (chuchu, cenoura, brócolis) e frutas (melão, mamão), sendo todas as amostras coletadas de forma asséptica em sacos estéreis e identificados.

Os cardápios das creches são programados, porém estão sujeitos a alterações, pois pode ocorrer falta de algum ingrediente. Desta forma, o cardápio é reformulado e montado visando satisfazer as necessidades nutricionais das crianças, referente a essa refeição. As refeições são produzidas no próprio local onde consumidas, nas creches.

As amostras foram acondicionadas em caixa térmica, com registro de temperatura (termômetro de máxima e mínima) durante o transporte ao laboratório, sendo esse tempo de transporte não superior à uma hora.

Os alimentos foram analisados de acordo com o que preconizado na RDC 12 de 2001 (amostra representativa), na sessão de alimentos pronto para consumo (anexo I), sendo coletado cinco amostras de cada alimento (n= 5), onde foram pesquisados: coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* e Clostrídios sulfito

reduzidos a 46⁰C, de acordo com cada alimento. Mesmo não tendo a obrigatoriedade na legislação, foi realizada contagem de bactérias mesófilas aeróbias em todas as amostras.

4.1.2 Amostragens de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores

Foi realizado estudo em três creches, coletado amostras de swabs de superfícies e utensílios: Pia (25cm²), porta de geladeira (25 cm²), botões de fogão (superfície de uma unidade), utensílio (uma unidade de utensílio).

Selecionado aleatoriamente indivíduos manipuladores dos alimentos no ato da preparação dos alimentos, sendo coletada amostra das mãos de um indivíduo por creche.

Os utensílios, equipamentos e mãos dos funcionários foram amostrados pelo método de contato por *swab*. Para preparo, os *swab* foram acondicionados individualmente em tubos de ensaio com tampas de rosca contendo 10 mL de solução salina tamponada estéril. Procedeu-se a amostragem mantendo-se a haste em posição que permitia contato contínuo entre cabeça do *swab* e a superfície amostrada, esfregando-a lentamente e firmemente, várias vezes, invertendo a direção entre sucessivos esfregões na área de interesse. Após a amostragem, os *swabs* foram retornados aos tubos. Os tubos contendo as amostras foram mantidos refrigerados em caixa térmica com temperatura monitorada durante o transporte até o laboratório, com tempo de transporte menor que uma hora.

Procedimento de amostragem por *swab*

➤ Mãos dos manipuladores

Inicialmente, os objetivos e a importância do trabalho foram expostos aos funcionários, procurando-se vencer a possível resistência com relação à coleta das amostras, sendo solicitado assinatura do termo livre esclarecido (anexo II). As mãos foram amostradas por passagens sucessivas dos *swabs* nas regiões palmar, dorsal, entre os dedos, no leito ungueal nas mãos direita e esquerda de cada funcionário estudado.

➤ Utensílios

Para cada tipo de utensílio estudado, foram escolhidos aleatoriamente, no local onde estavam guardados, sendo realizadas coletas nas tabuas de corte, facas e talheres.

4.2 MÉTODOS PARA ANÁLISES DOS ALIMENTOS

4.2.1 Preparo das amostras de alimentos para análises.

Foi realizado pesagem de 25g da amostra em saco estéril em condições assépticas, adicionando posteriormente 225 ml de água peptonada 0,1% homogeneizando a amostra em Stomacher (Marca: Seward modelo 400, por 120 segundos na velocidade rápido), sendo essa a primeira diluição decimal (10^{-1}), seguido de mais duas diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}).

4.2.2 Contagem de Coliformes Termotolerantes:

Comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5 - 45,5 C°, com produção de gás. A contagem desse grupo foram realizadas de acordo com o método Número Mais Provável (NMP) de 3 tubos. Partindo do preparo da amostra (item 4.3.1) foram realizados os testes: 1^o – Teste presuntivo : Transferindo três alíquotas de um ml de cada diluição realizada anteriormente para tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubando os mesmos por 24-48h a 35^oC, considerando positivo os tubos que apresentarem turvação e produção de gás (evidenciado no tubo de Durham). 2^o – Teste confirmativo para coliformes totais: partindo dos tubos com resultado positivo no Caldo LST, retirando uma alçada e inoculando em Caldo Verde Brilhante 2% (VB), incubando-se por 24-48h a 35^oC, realizando a contagem de coliformes totais (NMP/g). 3^o - Teste confirmativo de coliformes termotolerantes: retirou-se uma alçada dos tubos positivos no caldo LST e inoculando em Caldo *E. coli* (EC), foi incubado por 24h a 44,5^oC (em banho-maria), realizando a contagem de coliformes termotolerantes (NMP/g), para confirmação de *E. coli* , foram repicadas, uma alçada do calco EC em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-BEM), incubando por 24h a 35^oC. Na presença de colônias típicas realizou-se testes bioquímicos (Teste de Indol, teste de citrato, teste de vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer) (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

4.2.3 Contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva*

Método de Contagem direta em Placas:

Este método foi realizado após, o preparo das amostras (item 4.3.1), retirando-se 1 ml da diluição 10^{-1} e dividindo o volume (0,3ml, 0,3ml, 0,3ml e 0,1ml) em quatro placas contendo Ágar Baird-Parker (BP) suplementado com solução salina de gema de ovo e telurito de potássio, realizando espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski em superfície, das diluições 10^{-2} e 10^{-3} retirando 0,1mL e inoculando em superfície. Todas as placas foram incubadas por 45-48h a $35-37^{\circ}\text{C}$, realizou-se contagem das colônias típicas. Cinco colônias típicas foram selecionadas e transferidas para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Cada colônia teve sua massa bem dissolvida no caldo BHI e a partir deste caldo com as bactérias realizou-se o teste de coagulase, transferindo 0,2 ml de cultura para um tubo estéril e acrescentando 0,5 mL de plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Misturou-se com movimentos de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação e Incubou-se a $35-37^{\circ}\text{C}$, com observação periódica, durante seis horas verificando ou não a formação de coágulo. Ao final das seis horas, a coagulação completa de todo tubo foi considerada reação positiva de nível 4+, sendo incompleta a coagulação, são necessários testes adicionais (coloração de Gram, catalase, termonuclease) (LANCETTE & BENNETT, 2001)

4.2.4 Contagem de *Bacillus cereus*

Método de Contagem Direta em Placas:

Este método foi realizado, após, o preparo da amostra (item 4.3.1), retirou-se 1 ml da diluição 10^{-1} e dividi-se o volume (0,3ml, 0,3ml, 0,3ml e 0,1ml) em quatro placas contendo Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixa (MYP), realizando espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski em superfície, das diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Um volume de 0,1ml e foi retirada e inoculando em superfície, incubando todas as placas por 20-24h a $30-32^{\circ}\text{C}$ e realizando posteriormente contagem das colônias típicas encontradas. Pelo menos cinco colônias típicas foram selecionadas, transferidas cada colônia para tubos contendo Ágar Nutriente (NA) e incubados por 24h a 30°C . A partir deste crescimento em NA, foram realizados testes bioquímicos (teste de Voges – Proskauer, teste de redução de nitrato, teste de utilização

anaeróbia de glicose), teste crescimento rizoide e teste de motilidade (BENNETT & BELAY, 2001).

4.2.5 Contagem de Clostrídios Sulfito Redutores a 46 °C em Alimentos

Método de Contagem Direto em Placas

Para esse método as amostras foram preparadas (item 4.3.1), retirou-se 1 ml de cada diluição e inoculou-se cada alíquota em placa de Petri contendo Agar Shahidi Ferguson Perfringens (SFP). As placas foram incubadas a 46°C por 24h em anaerobiose, realizando, posteriormente, coloração de Gram nas colônias típicas e para confirmação, assim como os testes de redução de nitrato e catalase (BRASIL, 2001; APHA, 1984).

4.2.6 Pesquisa de presença e ausência de *Salmonella* spp. em Alimentos

Para este método foi realizado pré-enriquecimento com 25g do alimento (pesando assepticamente) com 225 ml de Água Peptonada Tamponada (BPW) homogeneizado em Stomacher (Marca: Seward, modelo 400, por 120 segundos na velocidade rápida), incubado por 18 +/- 2h a 37°C. A partir deste cultivo, foi realizado o enriquecimento seletivo, retirando 0,1 ml em 10ml de Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) e 1ml para 10ml de Caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn). Os tubos foram incubados a 41,5°C (RVS) por 24 +/- 3h e o a 37°C (MKTTn) por 24 +/- 3 h. O plaqueamento diferencial para cada cultura em RVS e MKTTn, foi realizado estriando uma alçada (estrias de esgotamento) em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e em Agar Bismuto Sulfito (BSA). As colônias típicas que apresentaram crescimento nestes meios foram ser inoculadas em placas de Ágar Nutriente (NA). Colônia isolada foi utilizada para realização dos testes bioquímicos (Teste de crescimento em Ágar Tríplice açúcar Ferro (TSI), Teste de Indol, Teste de Voges – Proskauer, Teste de Vermelho Metila e Teste de Citrato) e teste sorológico somático polivalente (ISO , 2007).

4.2.7 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios

A contagem de mesófilos foi realizada após, preparo das amostras (item 4.3.1). Um volume de 1 ml de cada diluição em duplicata foi inoculado em placas de Petri estéreis, vertendo posteriormente nas placas 15 a 20 ml de ágar padrão para contagem Plate Count Agar (PCA), previamente fundido e resfriado a 45°C. O inóculo foi homogeneizado como o meio de cultura, movimentando em uma superfície plana com movimentos circulares na forma de oito, no sentido horário e anti-horário. Após solidificação do meio de cultura das placas as mesmas foram incubadas a 35°C por 48h, realizando-se a contagem das colônias de mesófilos aeróbios nas placas (MORTON, 2001) .

4.3 MÉTODOS PARA ANÁLISES DE SUPERFÍCIES, UTENSÍLIOS E MÃOS DE MANIPULADORES.

4.3.1 Contagem de Coliforme termotolerante

A contagem desse grupo foram realizadas de acordo com o método Número Mais Provável (NMP) de 3 tubos, foi realizado quatro diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) partindo do tubo inicial (10^{-1}): 1^o – Teste presuntivo : Transferindo três alíquotas de um ml de cada diluição realizada anteriormente para tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubando os mesmos por 24-48h a 35°C, considerando positivo os tubos que apresentarem turvação e produção de gás (evidenciado no tubo de Durham). 2^o – Teste confirmativo para coliformes totais: partindo dos tubos com resultado positivo no Caldo LST, retirando uma alçada e inoculando em Caldo Verde Brilhante 2% (VB), incubando-se por 24-48h a 35°C, realizando a contagem de coliformes totais (NMP/g). 3^o - Teste confirmativo de coliformes termotolerantes: retirou-se uma alçada dos tubos positivos no caldo LST e inoculando em Caldo *E. coli* (EC), foi incubado por 24h a 44,5°C (em banho-maria), realizando a contagem de coliformes termotolerantes (NMP/g), para confirmação de *E. coli* , foram repicadas, uma alçada do caldo EC em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-BEM), incubando por 24h a 35°C. Na presença de colônias típicas realizou-se testes bioquímicos (Teste de Indol, teste de citrato, teste de vermelho de metila, teste de Voges-Proskauer) (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

4.3.2 Contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva*

Este método foi realizado após, a realização de mais quatro diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), partindo do tubo inicial (10^{-1}). Retirando-se 1 ml da diluição 10^{-1} e dividindo o volume (0,3ml, 0,3ml, 0,3ml e 0,1ml) em quatro placas contendo Ágar Baird-Parker (BP) suplementado com solução salina de gema de ovo e telurito de potássio, realizando espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalski em superfície, das diluições 10^{-2} e 10^{-3} retirando 0,1mL e inoculando em superfície. Todas as placas foram incubadas por 45-48h a $35-37^{\circ}\text{C}$, realizou-se contagem das colônias típicas. Cinco colônias típicas foram selecionadas e transferidas para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Cada colônia teve sua massa bem dissolvida no caldo BHI e a partir deste caldo com as bactérias realizou-se o teste de coagulase, transferindo 0,2 ml de cultura para um tubo estéril e acrescentando 0,5 mL de plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Misturou-se com movimentos de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação e Incubou-se a $35-37^{\circ}\text{C}$, com observação periódica, durante seis horas verificando ou não a formação de coágulo. Ao final das seis horas, a coagulação completa de todo tubo foi considerada reação positiva de nível 4+, sendo incompleta a coagulação, são necessários testes adicionais (coloração de Gram, catalase, termonuclease) (LANCETTE & BENNETT, 2001).

4.3.3 Contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios

A contagem de mesófilos foi realizada após, a realização de mais quatro diluições (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), partindo do tubo inicial (10^{-1}). Um volume de 1 ml de cada diluição em duplicata foi inoculado em placas de Petri estéreis, vertendo posteriormente nas placas 15 a 20 ml de ágar padrão para contagem Plate Count Agar (PCA), previamente fundido e resfriado a 45°C . O inóculo foi homogeneizado como o meio de cultura, movimentando em uma superfície plana com movimentos circulares na forma de oito, no sentido horário e anti-horário. Após solidificação do meio de cultura das placas as mesmas foram incubadas a 35°C por 48h, realizando-se a contagem das colônias de mesófilos aeróbios nas placas (MORTON, 2001) .

5. RESULTADOS

5.1 Resultados das análises dos alimentos

Das quatro creches avaliadas, foram coletados 30 alimentos, utilizando um número de amostragem igual a $n = 5$.

O maior número de amostras coletadas foi classificado no grupo de cereais (43%), seguido pelo grupo de leguminosas (23,3%), grupo a base de carnes (23,5%) e grupo de frutas (10%) conforme Figura 8.

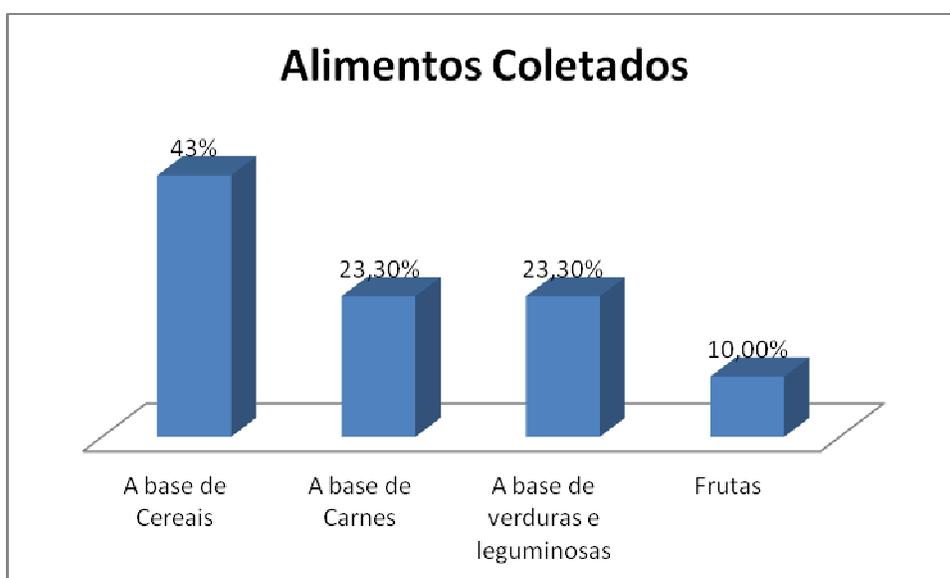


FIGURA 7. Distribuição dos grupos de alimentos servidos em Creches da rede Pública de Campinas.

5.1.1 Resultados creche A

Os resultados obtidos nas duas coletas na creche A (Tabela 4), são da média obtida das análises das cinco amostras de cada alimento ($n=5$).

Resultados da primeira coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

O alimento salada de tomate foi o que apresentou uma maior contagem média de mesófilos aeróbios de $2,50 \times 10^2$ UFC/g e uma contagem de Coliforme termotolerantes de 10^2 NMP/g (média), três amostras apresentaram valor superior a 10^2 NMP/g desta forma este alimento está em desacordo com a legislação, sendo impróprio para o consumo; foi confirmado por testes bioquímicos a presença de *E. coli* em todas as amostras.

O alimento, frango cozido apresentou uma contagem de Clostrídios sulfito redutores a 46°C <10 UFC/g, *Staphylococcus* coagulase positiva <10 UFC/g e *Bacillus cereus* <10 UFC/g, com uma contagem de aeróbio mesófilos totais de $1,3 \times 10^1$ UFC/g. Já o feijão foi o alimento que apresentou: contagem de aeróbios mesófilos <10 UFC/g, contagem de <3 NMP/g para coliformes termotolerantes e para *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* coagulase positiva contagem de <10 UFC/g

O arroz apresentou contagem de mesófilos aeróbios de $2,0 \times 10^1$ UFC/g na média, *Staphylococcus* coagulase positiva <10 UFC/g, Coliforme termotolerante apresentou uma contagem <3 NMP/g e uma contagem de 8×10^0 UFC/g de *Bacillus cereus*, estando dentro dos limites estabelecidos pela legislação (RDC 12 de 2001 / limite de 10^3 UFC/g para *Bacillus cereus*).

Resultados segunda coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Todos alimentos analisados apresentaram contagem de coliformes termotolerantes <3 NMP/g. Os alimentos arroz, feijão e repolho cozido apresentaram contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva <10 UFC/g e *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

O alimento carne cozida apresentou contagem de Clostrídios sulfito redutores a 46°C <10 UFC/g, *Staphylococcus* coagulase positiva <10 UFC/g e *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

O arroz apresentou uma contagem total de mesófilos aeróbios de $3,5 \times 10^1$ UFC/g, o feijão $2,0 \times 10^1$ UFC/g, repolho cozido 10×10^0 UFC/g e carne cozida $3,0 \times 10^1$ UFC/g.

TABELA 4 – Creche A - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).

Primeira coleta

Alimento	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. Aus/Pres*	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Clostrídios sulfito redutores a 46°C (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Arroz	<3	Ausência	8x10 ⁰	<10	N/A**	2,0 x 10 ¹
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	<10
Salada de tomate	1,02 x 10 ²	Ausência	N/A	N/A	N/A	2,5 x 10 ²
Frango ao molho	<3	Ausência	<10	<10	<10	1,3 x 10 ¹

Segunda coleta

Arroz	<3	Ausência	<10	<10	N/A**	3,5 x 10 ¹
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	2,0 x 10 ¹
Repolho cozido	<3	Ausência	<10	<10	N/A	1,0 x 10 ¹
Carne cozida	<3	Ausência	<10	<10	<10	3,0 x 10 ¹

*Aus/Pres: Ausência ou presença de *Salmonella* em 25g de alimentos

** N/A: Não aplicável segundo RDC 12 de 2001 da ANVISA

5.1.2 Resultados creche B

Os resultados obtidos nas duas coletas na creche B (Tabela 5), são da média obtida das análises das cinco amostras de cada alimento (n=5).

Resultados primeira coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Todos os alimentos apresentaram contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva <10UFC/g, Coliforme termotolerante <3 NMP/g e *Bacillus cereus* <10UFC/g.

O alimento frango cozido apresentou contagem <10 UFC/g de Clostrídios sulfito redutores a 46 °C.

Os alimentos apresentaram uma contagem média de mesófilos aeróbios de: arroz $1,8 \times 10^1$ UFC/g, feijão 9×10^0 UFC/g, couve cozida 8×10^0 UFC/g e frango cozido 5×10^0 UFC/g

Resultados segunda coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Os alimentos arroz, feijão e acelga cozida apresentaram uma contagem de coliformes termotolerantes <3 NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g, contagem de *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

O alimento melão apresentou contagem de coliforme termotolerante <3 NMP/g e uma contagem total de mesófilos aeróbios de 18×10^2 .

Carne moída apresentou contagem de coliforme termotolerante <3 NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g, contagem de *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

A contagem total de mesófilos aeróbios no arroz foi de $4,0 \times 10^1$ UFC/g, feijão $3,0 \times 10^1$ UFC/g, acelga cozida 1×10^1 UFC/g e carne moída 6×10^1 UFC/g.

TABELA 05 - Creche B - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).

Primeira coleta

Alimento	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. Aus/Pres*	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Clostrídios sulfito redutores a 46°C (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Arroz	<3	Ausência	<10	<10	N/A**	1,8 x 10 ¹
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	9 x 10 ⁰
Couve cozida	<3	Ausência	<10	<10	N/A	8 x 10 ⁰
Frango ao molho	<3	Ausência	<10	<10	<10	5 x 10 ⁰

Segunda coleta

Arroz	<3	Ausência	<10	<10	N/A**	4 x 10 ¹
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	3 x 10 ¹
Acelga cozida	<3	Ausência	<10	<10	N/A	1 x 10 ¹
Carne moída	<3	Ausência	<10	<10	<10	6 x 10 ¹
Melão	<3	Ausência	N/A	N/A	N/A	18 x 10 ¹

*Aus/Pres: Ausência ou presença de *Salmonella* em 25g de alimentos

** N/A: Não aplicável segundo RDC12 de 2001 da ANVISA

5.1.3 Resultados creche C

Os resultados obtidos nas duas coletas na creche C (Tabela 6), são da média obtida das análises das cinco amostras de cada alimento (n=5).

Resultados primeira coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Dos alimentos analisados o mamão foi o que apresentou contagem de Coliforme termotolerantes de 8 NMP/g (média), desta forma este alimento está em conformidade com a legislação, onde o limite é 5×10^2 UFC/g para amostra indicativa. A contagem de mesófilos aeróbios foi de 1×10^2 UFC/g na média.

O alimento frango ao molho apresentou ausência de Clostrídios sulfito redutores a 46°C , *Staphylococcus* coagulase positiva e *Bacillus cereus*, com uma contagem média de aeróbios mesófilos de $1,2 \times 10^1$ UFC/g.

Os alimentos feijão e chuchu cozido apresentaram ausência de Coliforme termotolerantes, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

Em relação à contagem média de mesófilos aeróbios o feijão apresentou $3,3 \times 10^1$ UFC/g; já o chuchu apresentou $1,2 \times 10^1$ UFC/g.

O arroz apresentou contagem média de mesófilos aeróbios de $2,6 \times 10^1$ UFC/g na média, ausência de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, Coliforme termotolerante, com uma contagem de *Bacillus cereus* ($4,6 \times 10^1$ UFC/g), estando dentro dos limites estabelecidos pela legislação (RDC 12 de 2001 / limite de 10^3 UFC/g para amostra indicativa).

Resultados segunda coleta:

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Os alimentos macarrão ao molho e repolho cozido apresentaram uma contagem de coliformes termotolerantes <3 NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g, contagem de *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

A salada de alface apresentou uma contagem de coliforme termotolerante de 11 NMP/g, porém, dentro dos limites estabelecidos pela RDC 12 de 2001.

O alimento almôndegas apresentou uma contagem de coliformes termotolerantes < 3 NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g, contagem de *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

As contagens totais de mesófilos aeróbios da salada de alface em 2×10^2 , macarrão 5×10^1 , almôndegas 2×10^1 , repolho cozido 3×10^1 .

TABELA 06 – Creche C - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento (primeira e segunda coleta).

Primeira coleta

Alimento	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. Aus/Pres*	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Clostrídios sulfito redutores a 46°C (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Arroz	<3	Ausência	4,6 x 10 ¹	<10	N/A**	2,6 x 10 ¹
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	3,3 x 10 ¹
Chuchu cozido	<3	Ausência	<10	<10	N/A	1,2 x 10 ¹
Frango ao molho	<3	Ausência	<10	<10	<10	1,2 x 10 ¹
Mamão	8	Ausência	N/A	N/A	N/A	1 x 10 ²

Segunda coleta

Macarrão ao molho	<3	Ausência	<10	<10	N/A**	5 x 10 ¹
Repolho cozido	<3	Ausência	<10	<10	N/A	3 x 10 ¹
Salada de alface	11	Ausência	N/A	N/A	N/A	2 x 10 ²
Almondegas	<3	Ausência	<10	<10	<10	2 x 10 ¹

*Aus/Pres: Ausência ou presença de *Salmonella* em 25g de alimentos

** N/A: Não aplicável segundo RDC 12 de 2001 da ANVISA

5.1.4 Resultados creche D

Os resultados obtidos nas duas coletas na creche D (Tabela 7), são da média obtida das análises das cinco amostras de cada alimento (n=5).

Os resultados das análises de pesquisa de *Salmonella* spp. foram todos de ausência em 25g do alimento, estando de acordo com a legislação (RDC 12 de 2001).

Os alimentos feijão, carne cozida e macarrão com carne moída apresentaram uma contagem de coliformes termotolerantes < 3NMP/g, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g, contagem de *Bacillus cereus* <10 UFC/g.

A salada de brócolis e cenoura cozida apresentou uma contagem de $3,3 \times 10^1$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva, estando dentro dos limites de 10^3 UFC/g para amostra indicativa (RDC 12 de 2001). Os alimentos carne cozida picada e macarrão com carne moída apresentaram uma contagem de < 10 UFC/g de Clostrídio sulfito redutor a 46 °C.

As contagens de mesófilos aeróbios foram: Salada de brócolis $6,4 \times 10^1$ UFC/g, feijão $2,3 \times 10^1$ UFC/g, carne cozida picada $1,1 \times 10^1$ UFC/g e macarrão com carne moída $1,4 \times 10^1$ UFC/g.

TABELA 07 – Creche D - Média das contagens (n=5) dos diferentes grupos de micro-organismos por alimento.

Alimento	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. Aus/Pres*	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Clostrídios sulfito redutores a 46°C (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Macarrão com carne	<3	Ausência	<10	<10	N/A**	$1,4 \times 10^1$
Feijão	<3	Ausência	<10	<10	N/A	$2,3 \times 10^1$
Salada brócolis e cenoura	<3	Ausência	<10	$3,3 \times 10^1$	N/A	$6,4 \times 10^1$
Carne	<3	Ausência	<10	<10	<10	$1,1 \times 10^1$

*Aus/Pres: Ausência ou presença de *Salmonella* em 25g de alimentos

** N/A: Não aplicável segundo RDC 12 de 2001 da ANVISA

5.2 Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores.

5.2.1 Resultados creche A

Os resultados de contagens de coliformes termotolerantes em superfícies, utensílios e mãos de manipuladores foram menores que 3 NMP/g.

As contagens de estafilococos coagulase positiva foram < 10 UFC/g para mãos de manipulador e tabua de corte. Já em Pia (25 cm^2) 4×10^2 UFC/g, geladeira (25 cm^2) 3×10^2 UFC/g, fogão (botão) 1×10^2 UFC/g e utensílio (faca de corte) 1×10^2 UFC/g. As áreas amostradas apresentaram contagens totais de aeróbios mesófilos de: Pia (25 cm^2) $1,4 \times 10^6$ UFC/g, geladeira (25 cm^2) 5×10^4 UFC/g, fogão (botão) 5×10^2 UFC/g, mãos de manipulador 2×10^3 UFC/g, tabua de corte $1,8 \times 10^5$ e utensílio (faca de corte) $1,7 \times 10^6$ UFC/g.

TABELA 08 – Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche A

Amostra	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Pia (25 cm^2)	<3	4×10^2	$1,4 \times 10^6$
Geladeira (25 cm^2)	<3	3×10^2	5×10^4
Fogão (botão)	<3	1×10^2	5×10^2
Mão de manipulador	<3	<10	2×10^3
Tabua de corte	<3	<10	$1,8 \times 10^5$
Utensílios (Faca de corte)	<3	1×10^2	$1,7 \times 10^6$

5.2.2 Resultados creche B

Os resultados de contagens de coliformes termotolerantes em superfícies, utensílios e mãos de manipuladores foram menores que 3 NMP/g.

As contagens de estafilococos coagulase positiva foram < 10 UFC/g para pia (25cm²) e fogão (botão), mão de manipulador 1,07 x 10³ UFC/g, geladeira (25 cm²) 1 x 10³ UFC/g, utensílio (faca de corte) 4,8 x 10⁴ UFC/g e tabua de corte 1 x 10²UFC/g. As áreas amostradas apresentaram contagens totais de aeróbios mesófilos de: Pia (25 cm²) 1,8 x 10⁴ UFC/g, geladeira (25 cm²) 2 x 10³ UFC/g, fogão (botão) 4,3 x 10³ UFC/g, mãos de manipulador 5,4 x 10³ UFC/g, tabua de corte 2,4 x 10³ UFC/g e utensílio (faca de corte) 3,4 x 10⁴ UFC/g.

TABELA 9 - Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche B

Amostra	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Pia (25 cm ²)	<3	<10	1,8 x 10 ⁴
Geladeira (25 cm ²)	<3	1 x 10 ³	2 x 10 ³
Fogão (botão)	<3	<10	4,3 x 10 ³
Mão de manipulador	<3	1,07 x 10 ³	5,4 x 10 ³
Utensílio (faca de corte)	<3	4,8 x 10 ³	3,4 x 10 ⁴
Tabua de corte	<3	1 x 10 ²	2,4 x 10 ³

5.2.3 Resultados creche C

Os resultados de contagens de coliformes termotolerantes em superfícies, utensílios e mãos de manipuladores foram menores que 3 NMP/g.

As contagens de estafilococos coagulase positiva foram < 10 UFC/g para fogão (botão), utensílio (faca de corte) e tabua de corte, pia (25 cm²) 2,8 x 10² UFC/g, geladeira (25 cm²) 2,25 x 10² UFC/g e mão de manipulador 2 x 10³UFC/g. As áreas amostradas apresentaram contagens totais de aeróbios mesófilos de: : Pia (25 cm²) 1,9 x 10⁵ UFC/g , geladeira (25 cm²) 3 x 10⁴ UFC/g, fogão (botão) 4,2 x 10³ UFC/g, mãos de manipulador 4,5 x 10³ UFC/g, tabua de corte 2,1 x 10³ e utensílio (faca de corte) 4,8 x 10⁴UFC/g.

TABELA 10 – Resultados das análises de superfícies, utensílios e mãos de manipuladores creche C

Amostra	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)
Pia (25 cm ²)	<3	2,8 x 10 ²	1,9 x 10 ⁵
Geladeira (25 cm ²)	<3	2,25 x 10 ²	3 x 10 ⁴
Fogão (botão)	<3	<10	4,2 x 10 ³
Mão de manipulador	<3	2 x 10 ³	4,5 x 10 ³
Utensílio (faca de corte)	<3	<10	4,8 x 10 ⁴
Tabua de corte	<3	<10	2,1 x 10 ³

6. DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram ausência de *Salmonella* spp. em 25g da amostra, mesmo levando em conta o cardápio de três creches que apresentavam alimentos como frango, que frequentemente estão associados com surtos de *Salmonella* spp. O mesmo resultado foi encontrado em um estudo de caso em uma escola estadual em Santa Helena no PR que avaliou a qualidade microbiológica da merenda escolar (ROSSASI *et al* ,2007).

Segundo estudo realizado por COSTA *et al* (2008) que avaliou a qualidade microbiológica de pratos frios servidos em restaurantes self-service na cidade de Palmas (TO), também obtiveram ausência de *Salmonella* spp. em suas análises. Entretanto, KAKU (1995) identificou *Salmonella* em um surto alimentar em uma escola no noroeste de São Paulo, onde 211 pessoas foram afetadas. O alimento envolvido foi maionese que foi produzida na própria escola.

Em 1999, ocorreu um surto alimentar causado por *Salmonella* spp. na Escola Municipal Sobral Pinto, Belo Horizonte, onde foi servido o prato Baião-de-Três (frango, arroz e feijão). Segundo o diretor da escola, o frango que foi utilizado foi preparado no dia anterior ao dia da distribuição, ficando em temperatura ambiente. Tal procedimento, portanto, indicou um erro de manipulação e, conseqüentemente, causou o surto alimentar, propiciando condições favoráveis para os micro-organismos que estavam presentes no alimento (FIRMO, 2010).

Outra situação importante envolvida nos surtos alimentares é a contaminação cruzada, onde alimentos prontos para o consumo são manipulados com os mesmos utensílios (facas, tabuas, vasilhas) que foram utilizados para manipular (cortar, picar, descascar etc.) produtos crus, estando estes utensílios higienizados de forma inadequada. PICOLLO *et al*. (1992), ao investigarem um surto de salmonelose em cantina escolar no município de São Paulo-SP, consideraram como fator desencadeante a contaminação cruzada de legumes cozidos em contato com frango cru, através da utilização dos mesmos equipamentos e superfícies com deficiente higienização.

Estudo realizado por BERNABÉ (2005), em restaurantes do campus da Universidade de Franca, avaliou a presença de patógenos envolvidos em surtos alimentares pelo uso de esponjas, panos de prato e placas de cortes contaminados. Nesse estudo, identificou a presença de *Salmonella* ssp. em esponjas utilizadas para limpeza dos utensílios utilizados na cozinha, o que mostra as várias formas que um alimento pode ser contaminado.

As análises das amostras referentes à pesquisa de Clostrídios sulfito redutores a 46°C mostraram contagens <10 UFC/g desses micro-organismos. PASSOS *et al.*, (2008) também não encontraram a presença destes micro-organismos nos alimentos analisados.

FORTUNA (2000), avaliando a qualidade microbiológica das preparações de carne bovina servida na merenda escolar de escolas municipais e estaduais no Rio de Janeiro (RJ), não evidenciou a presença dos Clostrídios sulfito redutores, mostrando resultados coerentes com os encontrados no presente estudo.

De outra forma, resultados encontrados por TAVARES e SERAFINI (2003) em amostras de hambúrgueres de carne bovina comercializado em Goiânia (GO), mostram a contaminação por Clostrídios sulfito redutores de 2% das amostras coletadas, demonstrando a presença desses micro-organismos em alimentos cárneos mal processados.

Uma ocorrência de surto alimentar foi em 1978, na cidade de Campinas (SP), envolvendo mais de 500 pessoas. Tratou-se de um grande surto provocado por *Clostridium perfringens*, devido ao consumo de carne assada em dois restaurantes. Em Jaboticabal (SP), ocorreu um grande surto também em 1981, envolvendo mais de 700 pessoas em um restaurante universitário, devido o consumo de carne de porco assada (HARES *et al.*, 1998, p. 29).

Segundo CDC (2009), um surto alimentar ocorreu em uma prisão do condado de Wisconsin (EUA), envolvendo 100 indivíduos, onde o micro-organismo causador foi o *Clostridium perfringens* e o alimento envolvido foi carne de peru moída.

Investigação sobre um surto alimentar em uma creche de Limeira, SP (2002) onde 30 crianças foram acometidas, sendo o agente etiológico possível o *Clostridium perfringens* (RITTI, 2003), foi realizado, e esses dados mostram como esses micro-organismos estão dispersos no ambiente, podendo levar a casos sérios de surtos alimentares.

Os resultados obtidos referentes à pesquisa e contagem de *Bacillus cereus* nos alimentos amostrados, evidenciam a presença desse micro-organismo em 6,5 % das amostras onde se aplica sua pesquisa. Mesmo em baixa contagem, mostra-se presente no alimento (arroz) e uma vez que, as condições forem favoráveis, irão se multiplicar e causar um surto alimentar importante. Entretanto, os valores encontrados se enquadram dentro dos limites preconizados pela Resolução RDC 12 de 2001 da ANVISA, onde o limite para esses micro-organismos é 10^3 UFC/g para amostra indicativa. Segundo ALTAYAR (2006), há uma grande porcentagem de cepas produtoras de toxinas eméticas, associada com arroz, sugerindo assim que a contaminação seja

mais comum em arroz, sendo esse alimento o principal veículo desse patógeno causador da síndrome emética.

De acordo com SOARES (2005), *B. cereus* foi detectado em 14,0% das amostras coletadas durante o processamento de carne assada. O *B. cereus* foi identificado, nas amostras pós-cozção ou sobrevivência dos esporos ao processo de cozção, o que indica que pode ter havido uma contaminação posterior a cozção.

Estudo realizado por MILAGRES (2004), mostra resultado de amostragens do ar e de superfícies de trabalho em cozinhas de restaurantes na cidade de Viçosa (MG), onde 61% das amostras de superfície estavam contaminadas com o *Bacillus cereus*. As análises do ar também mostraram contaminação com esse micro-organismo, indicando ser a possível fonte de contaminação de alimentos prontos para o consumo. FORSYTHE (2002) refere-se a que esse micro-organismo como comumente encontrado em baixa contagem em alimentos cozidos e prontos para o consumo, sendo o principal mecanismo de controle a prevenção da germinação dos esporos.

Outro surto relatado por SOTO *et al* (2005) ocorreu no município de Ibiúna, em 2003, sendo um surto de toxinfecção alimentar envolvendo 120 operários de uma empresa da região. A análise do alimento determinou que o agente patogênico envolvido foi o *B. cereus*, mostrando a presença deste micro-organismo em surtos alimentares e sua importância.

A pesquisa e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nos alimentos amostrados nesse estudo revelaram a presença em 3 % das amostras. Esse micro-organismo foi identificado em amostras de salada de brócolis com cenoura cozida. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nesse alimento estava dentro do limite estabelecido pela legislação RDC 12 de 2001 que é 5×10^2 UFC/g para amostra indicativa. Em se tratando de alimento cozido, esse micro-organismo não deveria estar presente, uma vez que apresenta baixa resistência ao calor. Como esse alimento foi cozido em pedaços grandes e, posteriormente, picado na temperatura de manipulação, sugere-se contaminação durante a manipulação do alimento.

De acordo com CHAVES (2012), em estudo da contaminação estafilocócica nas cozinhas de creches de Campinas (SP), analisou-se a presença de *Staphylococcus* spp. em superfícies, utensílios, mão e narinas dos manipuladores dos alimentos, 13% das amostras apresentaram *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas, confirmando assim a possibilidade da contaminação pela manipulação dos alimentos.

Pesquisas realizadas por COSTA (2002); GABAN & LEAL (2002) sobre a detecção de *Staphylococcus aureus* nas mãos e narinas de manipuladores de alimentos em escolas estaduais no município de Campo Grande (MS), apresentaram avaliação de mãos e narinas de 48 manipuladores de alimentos. Os resultados foram de 85 a 91% de presença de *Staphylococcus aureus*, reforçando o resultado encontrado no presente estudo, onde a contaminação dos alimentos possivelmente ocorreu posterior ao cozimento.

Segundo MICHELIN *et al* (2006), um surto de intoxicação estafilocócica envolvendo aproximadamente 1800 escolares da cidade de Birigui (SP), ocorrido em 1998, mostra que as condições higiênicas foram insatisfatórias e que as normas sanitárias para o preparo de alimentos foram negligenciadas, visto que o alimento envolvido foi uma farofa (alimento com grande manipulação em seu preparo). Com isso aproximadamente 90% das crianças acometidas, procuraram o serviço de saúde. No período deste surto alimentar a merenda escola era preparada em uma central e depois distribuída para as escolas e, desta forma, o tempo após o preparo propiciou o desenvolvimento desses micro-organismos.

A pesquisa de coliformes termotolerante mostrou uma contaminação de mais de 6,5% das amostras, sendo confirmado por testes bioquímicos a presença de *E. coli*, em uma amostra (3%) de salada de tomate, o que indicou a falta de condições higiênicas sanitárias adequadas no preparo. As contagens de coliformes termotolerantes nesse alimento ficaram acima do permitido pela legislação, estando classificado este alimento como impróprio para o consumo.

Nesse mesmo alimento (salada de tomate) foi encontrado uma contagem de mesófilos aeróbios de $2,5 \times 10^2$ UFC/g, considerada baixa quando comparada a outros estudos já realizados, ALVES & UENO (2010), encontraram contagens de até $9,7 \times 10^4$ UFC/g em salada de tomate servidas em restaurantes em Taubaté/SP, porém não foi evidenciado presença de *E. coli* ou *Staphylococcus coagulase positiva*.

De acordo com resultado de análise realizado pela ANVISA em 2009, em uma escola municipal de Belo Horizonte (MG), onde foi coletada uma amostra de couve, servida como salada crua no almoço, verificou-se que o alimento estava impróprio para o consumo, pois apresentava contagem de coliforme termotolerante acima do permitido (FIRMO, 2010).

Os resultados obtidos por ROSA (2008), em estudo realizado em escolas de Natal (RN), mostraram a presença de *E. coli* em 6,1% das amostras analisadas, sendo esse resultado o dobro do encontrado no presente estudo (3%), embora ROSA (2008) tenha pesquisado em carnes.

PASSOS *et al* (2008), relataram surto alimentar ocorrido em uma empreiteira da construção civil em Cubatão (SP), onde 54 funcionários foram afetados. O alimento envolvido foi carne assada com contaminação de coliformes termotolerantes numa concentração de 28 NMP/g, mostrando a patogenia desse grupo de micro-organismos, mesmo em baixa contagem.

A presença de *E. coli* em alimentos indicam condições higiênicas sanitárias insatisfatórias na preparação dos alimentos, seja pela manipulação desses ou pela maneira insatisfatória e falta de treinamentos com que os fazem (BRUM, 2004).

O alimento que apresentou presença de *E. coli* foi à salada de tomate. Estudo realizado por ALVES & UENO (2010), onde foram analisados vários alimentos servidos em 16 restaurantes self-service no município de Taubaté (SP), não se encontrou a presença de *E. coli* em amostras de salada de tomate.

VIEIRA (2005) ressaltou a importância do cozimento correto para a redução da contagem de patógenos, e da mesma forma, no presente trabalho, não foram encontrados coliformes termotolerantes nos alimentos que passaram pelo processo de cocção, mostrando a eficiência do processo de cocção nas creches estudadas.

As contagens totais de mesófilos aeróbios nos alimentos analisados foram baixas, indicando uma boa qualidade microbiológica. Foi verificado que os alimentos são preparados e logo consumidos, tendo pouco tempo de exposição, o que pode justificar baixas contagens. Já na pesquisa realizada por ALVES & UENO (2010), com alimentos servidos em 16 restaurantes em Taubaté (SP), indicou uma alta contagem de mesófilos aeróbios em alimentos similares aos do presente estudo.

As análises das superfícies, utensílios e mãos de manipuladores indicaram contagem de coliformes termotolerantes <3 NMP/g em 100% das amostras, indicando uma baixa incidência desses micro-organismos nos locais estudados. Em estudo realizado por ZANON & PAGNAN (2005) em restaurante em ARAPONGAS-PR também encontraram resultados semelhantes com contagens de coliformes termotolerantes <3 NMP/g em 100% dos pontos estudados.

A pesquisa de estafilococos coagulase positiva em superfícies, utensílios e mãos de manipuladores indicaram que 61% dos pontos estudados apresentaram presença desses micro-organismos, em amostras como utensílio (faca de corte) foi obtido uma contagem desse micro-organismo em utensílio ($4,8 \times 10^3$ UFC/utensílio), indicando ineficiência no processo de limpeza e higienização desses utensílios. A contaminação de utensílios, superfícies e mão de

manipuladores com esses micro-organismos podem comprometer a segurança dos alimentos, após serem processados ocorrendo assim à contaminação cruzada, principalmente em alimentos que são manipulados após cocção. A presença desses micro-organismos nas mãos dos manipuladores foi de 66%, indicando a necessidade de melhorar a lavagem das mãos, ou diminuir o tempo entre as lavagens das mãos.

Estudo realizado por KOCHANOSKI *et al* (2009) evidenciou contaminação de *S. aureus* em 100% das amostras das mãos dos manipuladores de alimentos em uma unidade de alimentação em Araraquara-SP, sendo a porcentagem de contaminação superior a do presente estudo.

Pesquisa realizada por COELHO *et al* (2010) apresentaram contagens das mãos dos manipuladores superiores as encontradas no presente estudo, confirmando a alta contaminação das mãos dos manipuladores, sendo uma das principais fontes de contaminações de alimentos.

Considerando os limites estabelecidos pela APHA (2 UFC/cm² para superfícies e 100 UFC/utensílios) para contagens de aeróbios mesófilos em superfícies e utensílios, 100% das amostras apresentaram – se insatisfatórias, com contagens que chegaram a $1,7 \times 10^6$ UFC/utensílio. Resultados de KOCHANOSKI *et al* (2009), indicam contagens superiores ao estabelecidos pela APHA, estando 100% das superfícies, a contaminação de superfícies como tabua de corte pode ser um veículo importante de contaminação cruzada, onde alimentos crus são manipulados e na sequência alimentos cozidos são manipulados sem a devida higienização, causando a contaminação destes.

Não foi possível ampliar as coletas devido a problemas administrativos na Prefeitura Municipal de Campinas, desta forma o número de coletas foi reduzido, porém mesmo com numero de coletas realizadas foi possível verificar as condições microbiológicas dos alimentos, superfícies, utensílios e mão de manipuladores nas creches estudadas.

7. CONCLUSÃO

É necessário zelar pela segurança alimentar em creches e escolas, afinal nessa fase há toda a questão de formação física, psíquica e motor. Assim é necessário à realização de treinamentos dos manipuladores de forma periódica, pois as contaminações encontradas podem ter ocorrido devido à manipulação inadequada, haja vista que foi encontrada em mãos de manipuladores estafilococos coagulase positiva.

Os alimentos servidos nas creches analisadas apresentaram uma boa qualidade microbiológica, com um percentual de 97% de amostras dentro dos limites estabelecidos na legislação, com apenas um alimento cru que não se enquadrava na legislação RDC 12 de 2001 da ANVISA, um fator importante é que as creches produzem seu próprio alimento e são servidos logo após o seu preparo, minimizando assim, o aumento de uma baixa contagem de micro-organismos que ali possam estar presentes.

As superfícies das pias, equipamentos (geladeira e fogão), utensílios estudados apresentaram altas contagens de aeróbios mesófilos, estando os resultados muito acima dos estabelecidos pela APHA, indicando possivelmente uma deficiência na higienização destas superfícies.

A pesquisa de coliformes termotolerantes em superfícies das pias, equipamentos (geladeira e fogão), utensílios e mãos de manipuladores, se mostraram satisfatório.

As análises das superfícies das pias, equipamentos (geladeira e fogão), utensílios e mão de manipuladores em relação às contagens de estafilococos coagulase positiva se mostraram preocupantes, pois em condições favoráveis esses micro-organismos podem causar sérios surtos alimentares.

Estudos como esse, visam promover o bem estar da coletividade atuando na saúde pública com olhar voltado para a qualidade das necessidades básicas, sendo uma delas a alimentação. De posse dos dados apresentado por esse estudo foram realizadas palestras nas creches onde foram realizadas coletas, enfocando a necessidade melhorar a qualidade de condições sanitárias e de higiene para realizar a manipulação e adequado e preparo dos alimentos.

Esse estudo mostra a necessidade de ampliar os estudos na área de vigilância e saúde, haja vista que todos os estabelecimentos precisam alcançar níveis de satisfação alimentar excelente, em todos os níveis, garantindo assim uma alimentação saudável e como o mínimo possível de risco a saúde.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERC – Associação Brasileira das empresas de Refeições Coletivas. Manual ABERC de Práticas de elaboração e Serviço de Refeições para Coletividade. 8 ed., 2003. 287p.

ALMEIDA-MURIDIAN, L. B.; LATORRE, W. C. Registro de alimentos industrializados no Brasil. In: ALMEIDA-MURIDIAN, L. B.; PENTEADO, M. D. V. C . Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 2, p. 14-19

ALTAYAR M, SUTHERLAND AD. *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. J Appl Microbiol 2006;100:7–14.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1984. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 2nd ed., p. 483–495. American Public Health Association, Washington, D.C.

BAILEY, S.; RICHARDSON, L. J; COX, N.A.; COSBY, D.E. Salmonella. In: JUNEJA, V.K; SOFOS, J.N eds. Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and interventions. cap. 7, p. 108-118, Washington, DC:asm Press, 2010.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. – Os perigos para Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. Estado Português, 2003. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_4_perigos.pdf. Acesso em: 10/07/2012

BARBOSA, T. C. R. Surtos de algumas doenças transmitidas por alimentos no Brasil. [online]. 2009. 28 f. Monografia (Pós Graduação em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

BARRETO NSE, VIEIRA RHF. *Salmonella* versus manipuladores de alimentos: Um fator de risco para os consumidores. Hig Aliment. 2000; 14(72):53-9.

BERNABÉ, A. P. V.; CASTRO, G. P. P.; MARTINS, C. H. G. Pesquisa de *Salmonella sp* e contagem total de bactérias mesófilas aeróbias em panos de prato, esponjas e placas de corte em restaurantes da Universidade de Franca. 2005. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)-Universidade de Franca, Franca. Disponível em: http://www.unifran.br/2007/processoSeletivo/pesquisa/tcc/Ana_Paula_Veschi_Bernabe.pdf
Acesso em : 10/10/2012

BERSOT, L. S. *Salmonella* no Brasil: Sua importância no abate de aves. In: Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 5., 2006, Anais. Santa Maria, RS, 2006, p90-94

BERTÃO A. M.S., SARIDAKIS H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007

BOLT, H. M. Occupational versus environmental and lifestyle exposures of children and adolescents in the European Union. Article from Toxicology letters, Elsevier SCI, Germany, 2002

BRASIL (a), Ministério da Educação – Fundo Nacional de Desenvolvimento da educação (FNDE) Alimentação Escolar Disponível em: <http://www.fnde.gov.br/index.php/programas-alimentacao-escolar>. Acesso em 04/07/2012

BRASIL (b), Ministério da Educação – Fundo Nacional de Desenvolvimento da educação (FNDE) Alimentação Escolar. Disponível em: <http://www.fnde.gov.br/index.php/ae-dados-estatisticos>. Acesso em 10/07/2012

BRASIL (c). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde / UHA/CGDT. Dados epidemiológicos- DTA período de 2000-2011, 2012.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Lei no 11.346, de 15 de setembro de 2006. Cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional – SISAN. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/sedh/conanda>. Acesso em: 08/06/2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. : il. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL (a). Ministério da Educação - Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação. 2009 Resolução/CD/FNDE nº 38, de 16 de Julho de 2009 Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. Disponível em: <<http://www.fnde.gov.br/index.php/ae-legislacao>> Acesso em: 05/09/2012.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. 2009b. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em: 12 agosto 2011.

BRASIL . Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional - CNSAN. Alimentação e educação nutricional nas escolas e creches. (2004a) Disponível em: http://www.mds.gov.br/backup/institucional/conselhos1/Consea/11Alimentacao_Educacao.pdf> Acesso em: 19/08/2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.(2004b).Resolução - RDC nº 216, 15 de setembro de 2004 - Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2004/rdc/216_04rdc.htm. acesso em: 12/08/2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001a. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos em alimentos. Disponível em: http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php?mode=print_version&id=144. Acesso em: 12/06/2011.

BRUM, J.V.F. Análise de Perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba- PR. CURITIBA: Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, 2004. 107p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. Memórias do. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p.545-552, Oct. 2004.

CARMO, L. S. do *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, v. 19, n. 1, p.9-14,2002.

CARMO, G. M. I., OLIVEIRA, A. A., DIMECH, 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. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 6: 1-7. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: 30/06/2012

COELHO, A. Í. M., *et al* Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais - Ciência & Saúde Coletiva, 15(Supl. 1):1597-1606, 2010

COSTA, S. R. da; GABAN, C.R.G.; LEAL, C.R.B. Detecção de *Staphylococcus aureus* nas mãos e narinas de manipuladores de alimentos e avaliação das condições higiênicas das cozinhas, em escolas estaduais no município de Campo Grande- MS. Ensaios e Ciência, v. 6, n. 2. p 49-56, 2002.

COSTA, A. A.; SOUZA J., V. M.; COELHO, A. F. S. Avaliação microbiológica de saladas de vegetais servidas em restaurante self-service na cidade de Palmas, TO - Hig. Alimentar: 22(159): 27 – 32, mar.2008

COSTA H.F., BABBONI S.D., RODRIGUES, C.F., PADOVANI C.R., DUTRA I.S. & MODOLO J.R. 2012. Kinetics of colostral antibodies against epsilon toxin produced by *Clostridium perfringens* type D in lambs.

CASTRO, M., M., de M. IARIA, S., T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestibulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB, Brasil. Revista Saúde Pública, Vol. 18, n. 3, São Paulo. 1984.

CDC – 2009. Centers for Disease Control and Prevention - *Clostridium perfringens* Infection Among Inmates at a County Jail --- Wisconsin, August 2008 . February 20, 2009 / 58(06);138-141. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5806a2.htm> . Acesso em: 12/10/2012

CDC – 2011a. Centers for Disease Control and Prevention- Estimates of Foodborne Illness in the United States. Disponível at <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em: 12/12/2011

CDC – 2011B. Centers For Disease Control And Prevention. Foodborn illness. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g.htm#_whatoutbreak>. Acesso em: 16/10/ 2011b.

CDC- 2012. Centers for Disease Control and Prevention. General Information Escherichia coli . disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Acessado em: 10/10/2012

CHAVES, R.D.; AMARO, E.C.; TURATTI, M. A.; SILVA, A.R.; PEREIRA, J.L. Análise da contaminação estafilocócica em cozinhas creches "de Campinas, SP / Brasil - FOOD MICRO 2012, Istanbul (Turquia). De 3-7 de setembro 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4, 2003. Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene.

DANIELS, N. A. *et al.* Foodborne disease outbreaks in United states schools. *Pediatr. Infect. dis. J.* n 21, p. 623-628, 2002

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R, eds. Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007.

DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. *et al.*(Ed.). Foodborne microrganisms of public health significance. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.

DIAS, Danusa Martins *et al* . Morbimortalidade por gastroenterites no Estado do Pará. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 1, n. 1, mar. 2010 . Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232010000100008&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 15 nov. 2012.

EVANCHO GM, SVEUM WH, MOBERG LJ, FRANK JF. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: Downes FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, D.C.: APHA; 2001. p. 25-36.

DIAZ, J. C. ; ALVAREZ, C. R.; LÓPEZ, A. S. Estudo microbiológico de lãs comidas servidas em lós comedores escolares de La islã de Tenete. Revista salud Publica. V6, p 749 -760, 2003.

FDA/CFSAN BAD BUG BOOK. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook – 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf> . acesso em: 10/11/ 2012

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed- São Paulo: Atheneu, cap. 43, p 329-338,2008.

FIRMO, C. E. F. - Ocorrência de surtos alimentares em escolas de educação básica Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais – Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.microbiologia.icb.ufmg.br/monografias/163.PDF>. Acesso em: 14/11/2012

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Editora Artmed. 2000.

FORTUNA, J. L. Aspectos higiênico-sanitários no preparo de carne bovina servida em refeições escolares de instituições municipais e estaduais, no estado do Rio de Janeiro. Revista Higiene Alimentar. São Paulo: GT, 2002. v. 16, n. 95. p. 23-32.

FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 4 - 2008 www.revista-fi.com. SEGURANÇA ALIMENTAR. Segurança alimentar. Disponível em :<http://www.revista-fi.com/materias/54.pdf> . acesso em : 15/03/2012

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo. Editora Atheneu, 2003, 182 p.

FREITAS, M.C. S.; PENA, P. G. L. Segurança alimentar e nutricional: a produção do conhecimento com ênfase nos aspectos da cultura. Rev. Nutr., Campinas, v. 20, n. 1, Feb. 2007.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ª ed., New York, Berlin: Springer-Verlag, 2001, vol. 1, p. 119–166.

GERMANO, P. M. L., GERMANO M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 2.ed. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, Marília Isabel Simões. Alimentação escolar: ações da Vigilância Sanitária voltadas ao Programa de Alimentação Escolar. São Paulo, abr. 2008 – Disponível em: http://hivisa.blogspot.com.br/2008/07/aes-de-vigilncia-sanitria-voltadas-ao_25.html. Acesso em: 12/10/2011

HAEN, H. Conferência regional FAO/OMS sobre Segurança dos Alimentos em África. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/010/a0215p/A0215P17.htm> Acesso em : 11/12/2011.

HARES, L. F.; LISERRE, A. M. & SOUZA, M. L. Manual Técnico – Noções Básicas de Microbiologia e Parasitologia para Manipuladores de Alimentos – Olho Vivo na Qualidade – Módulo I. São Paulo : Friuli Consultoria e Serviços Técnicos S/C Ltda. 1998, 53 p.

HAZELWOOD, D.; MCLEAN, A.C. Manual de higiene para manipuladores de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1994.

HOLT, J. G. *et al.* Groups within the four major categories of bacteria. In: HOLT, J. G. *et al.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9ª ed., 1994, Baltimore: Williams & Wilkins.

HUANG, D. B. *et al.* Outbreak of Dysentery associated with ceftriaxone – resistant *Shigella sonnei*: first report of plasmid –mediated CMY 2 Type ampC – Lactamase resistance in *S. sonnei*. Journal of Clinical Microbiology. P 2608 – 2612, 2005

JAY, J. M. Gastroenterite Estafilocócica. In: JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed., 2005, Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489.

KOCHANSKI, S. *et al* - Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição. Alim. Nutr., Araraquara v.20, n.4, p. 663-668, 2009.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: APHA - American Public Health Association, 2001. Cap.8, p.69-82.

KRAMER JM & GILBERT RJ (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*. Foodborne Bacterial Pathogens (Doyle MP, ed), pp. 21–70. Marcel Dekker, New York.

LANDRY, M.L.; WARNOCK, D. W. Manual of Clinical Microbiology. Ed. 10 ed.p.603-626.ASM Press, Washington, D.C. 2011.

LITTLE, C.L.; AMAR, C.F.L.; AWOVISAYO, A.; GRANT, K.A. Hospital-acquired listeriosis associated with sandwiches in the UK: a cause for concern. Journal of Hospital Infection [online], v. 82, p. 13-18, 2012.

LUCCA, A.; TORRES, E.A F.S Condições de higiene de “cachorro-quente” comercializado em vias públicas. Revista de Saúde Pública, v.36 n.3; p.350-2, 2002.

MAZZILLI, R. N. A merenda no dia alimentar de crianças matriculadas em Centros de Educação e Alimentação do Pré-Escolar. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 21:317-25, 1987.

MAYER, L.¹; SILVA, W. P.- Análise Dos Surtos Notificados De Doenças Transmitidas Por Alimentos No Estado De São Paulo Entre 1995 E 2008. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil / v. 03, n. 02: p.81-96, 2009

MICHELIN, A. ; CARMO, L. S.; CARLOS, I. Z. – Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigui, São Paulo. Ver. Inst Adolfo Lutz. N 65, p 46-49, 2006.

MICHINO, H.; OTSUKI, K. Risk factors in causing outbreak of foodborne illness originating in schoollunch facilities in Japan, J. Vet med. Sci.n 62, p 557 -60, 2000

MILAGRES, R. C. R. M. – Universidade Federal de Viçosa – *Bacillus cereus* em unidades de alimentação e nutrição: avaliação do ar e de superfícies de trabalho. 2004

NATARO, J. P.; BOPP, C. A.; KAPER, J. B.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*.. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.;

OMS – Organização Mundial da Saúde. Sixty-Third World Health Assembly. OMS, 2010. disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/en/> - acesso em: 10/05/2012

OMS – Organização Mundial da Saúde. Outbreaks of E. coli O104:H4 infection – 2011 Disponível em: http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli_o104h4-infection-update-30 - acesso em: 15/05/2012

OLIVEIRA J. J. Surtos Alimentares de Origem Bacteriana: Uma Revisão. Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Dissertação de Mestrado 2012.

OLIVEIRA, M. A. GONÇALVES, M. O. SHINOHARA, N. K. S. STAMFORD, T. L. M. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. Higiene Alimentar. 17v., nº114/115, 2002. p. 12-23

OPAS/OMS – 2008. Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008. 160p.

PANETTA, J. C. A empresa de alimentos e o compromisso com o meio ambiente. Editorial. São Paulo: Revista Higiene Alimentar, 1999. v. 13, p.66-67.

PAKALNISKIENE, J. *et al.* A foodborne outbreak of enterotoxigenic E. coli and salmonella anatum. Infection after a high- school dinner in Denmark, November, 2006, epidemiol. Infect. N 137, p 396-4001, 2009.

PEDRAZA, D.F.; ANDRADE, S.L.L.S. A alimentação escolar analisada no contexto de um programa de alimentação e nutrição. Rev. Brasileira em Promoção da Saúde, v.19, n. 3, pp. 164-174, 2006.

PICOLLO, R. C. *et al.* Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo em 1991. Revista Higiene Alimentar, v. 6, n. 23 p. 28-30, 1992.

PIRAGINE, K. O. Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PISTORE, A.R.; GELINSKIB, J.M.L.N. Avaliação dos conhecimentos higiênico-sanitários dos manipuladores de merenda escolar: fundamento para treinamento contínuo e adequado. Revista Higiene Alimentar, v. 20, nº 146, 2006.

RAPINI, L.,S.; CERQUEIRA, M.,M.,O.,P.; CARMO,L.,S.; VERAS,J.,F.; SOUZA, M.,R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.V.57,n.6, Belo Horizonte, Dez./2005.

RODRIGUES, G.K.D. Segurança alimentar em unidades de alimentação e nutrição escolar: aspectos higiênicos-sanitários e produção de resíduos orgânicos . 2007. Dissertação de mestrado- Universidade Federal de Viçosa, 2007.

RAVAGNANI, E. M. – Subsídios à Implementação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Unidade de Alimentação e Nutrição Infantil. Piracicaba, 2007 139p.:II

ROSA, M. S. – Avaliação das condições higiênico – sanitárias da produção de refeições a base de carne da alimentação escolar no Município de Natal (RN) - 2008 . Dissertação de mestrado – Universidade Federal do rio Grande do Norte

RITTI R. M., *et al* Investigação de um surto de diarreia em creche - Limeira, SP, 2002 Revista Eletrônica de Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos Vol. 3, No. 5, 1 de Setembro, 2003

SÃO PAULO, 2008. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - SES/SP, Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE, Doenças Transmitidas por Alimentos, Estado de São Paulo.1999-

2008. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/hidri_vdtaa.htm < acesso em: 11/12/2012.

SANTOS., A., L.; SANTOS, D., O.; FREITAS, C., C.; FERREIRA, B., L., A.; AFONSO, I., F.; RODRIGUES, C., R.; CASTRO, H., C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal brasileiro de patologia medica laboratorial*. Vol. 43, n. 6. Rio de Janeiro. Dez/2007.

SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. *Journal of Food Protection*, v.68, n.3, p.636-648, 2005.

SCHRAFF R.L. 2010. Health-related costs from foodborne illness in the United States. Available at <http://www.producesafetyproject.org/admin/assets/files/Health-Related-Foodborne-Illness-Costs-Report.pdf-1.pdf>. Acesso em : 15/06/2012

SECRETÁRIA DE ESTADO DA SAÚDE/SP. Centro de Vigilância Epidemiológica/SP. Monitorização das doenças diarreicas agudas: Normas e instruções, 2ª edição, 2008.

SILVIA, N., JUNQUEIRA, V. C. A. , SILVEIRA, N. F. A. , TANIWAKI, M. H., SANTOS, R. F. S., GOMES, R. A. R. - Manual de Métodos de Análise. Microbiológica de Alimentos e Água. São Paulo - Livraria Varela Editora. 2010.

SOARES, C. M.; AZEREDO, R. M. C.; KUAYE, A. Y. – Análise da contaminação de preparações cárneas por *Bacillus cereus* em serviço de alimentação. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 2, p. 169-175, abr./jun. 2005.

SOTO, F. R. M.; RISSETO, M. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, A. M. G. Toxinfecção alimentar por *Bacillus cereus*: Relato de caso. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.19, n. 130, p. 35-36, 2005.

SOUZA, A. M. *et al.* Clonagem e expressão do gene da toxina épsilon de *Clostridium perfringens* tipo D e sua aplicação na imunização de animais. UFMG, Belo Horizonte, 2002.<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1056-2.pdf>

TAITT C.R, SHUBIN Y.S, ANGEL R. Detection of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* by using a Rapid, Array-Based Immunosensor. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70(1): 152-158.

TAVARES, T. M. & SERAFINI, A. B. – Avaliação Microbiológica de Hambúrgueres de carne bovina comercializado em sanduicheiras tipo trailers em Goiânia (GO) *rev. de patologia tropical* – Vol. 32 (1): 45-52. Jan-jun. 2003

TRABULSI, L.R., KELLER, R., TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases.*, v. 8, p. 508, 2002.

UZAL F.A. & SONGER G. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infection in sheeps and goats. *J. Vet. Diag. Invest.* 20:253-265.

VIEIRA, C. R. N.; SILVA, R. R.; MARTINHO, S. D.; CHAVASCO, J. K. Qualidade Microbiológica da Merenda Escolar Servida nas Escolas Estaduais de Poços de Caldas – MG. *Revista Higiene Alimentar*, vol. 19, n. 128, jan/fev, p. 90-93, 2005.

ANEXO I

Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (Tabela apenas de prato pronto para o consumo e frutas)

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV, do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3029, de 16 de abril de 1999, em reunião realizada em 20 de dezembro de 2000,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos;

considerando a definição de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, indispensáveis para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, da aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) e da qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doença Transmitida por Alimentos(DTA)

considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos harmonizados no Mercosul, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos para alimentos - Resoluções Mercosul GMC nº 59/93,

adotou a seguinte Resolução e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS, em Anexo.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 4º Fica revogada a Portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997, publicada no DOU de 2 de julho de 1998.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE OS PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS

1.ALCANCE

1.1OBJETIVO :

Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos especificados no Anexo I e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano especificados no Anexo II.

1.2ÂMBITO DE APLICAÇÃO

Este Regulamento se aplica aos alimentos destinados ao consumo humano.

Excluem-se deste Regulamento os produtos alimentícios e as toxinas de origem microbiana, como as micotoxinas, para os quais existem padrões definidos em legislação específica.

Excluem-se também matérias-primas alimentares e os produtos semi-elaborados, destinados ao processamento industrial desde que identificados com os seguintes dizeres: "inadequados para o consumo humano na forma como se apresentam" ou "não destinados para o consumo humano na forma como se apresentam".

2.CRITÉRIOS PARA O ESTABELECIMENTO DE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS EM ALIMENTOS.

Os critérios para estabelecimento de padrão microbiológico podem ser considerados isoladamente ou em conjunto conforme a seguir:

2.1.Caracterização dos microrganismos e ou suas toxinas considerados de interesse sanitário.

2.2.Classificação dos alimentos segundo o risco epidemiológico.

2.3.Métodos de análise que permitam a determinação dos microrganismos

2.4.Plano de Amostragem para a determinação do número e tamanho de unidades de amostras a serem analisadas.

2.5.Normas e padrões de organismos internacionalmente reconhecidos, Codex Alimentarius e outros organismos.

Outros critérios, quando evidências científicas o justifiquem.

3.DEFINIÇÕES

Para efeito deste regulamento adota-se as seguintes definições:

3.1.DTA: Doença Transmitida por Alimento causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico.

3.2.Amostra indicativa: é a amostra composta por um número de unidades amostrais inferior ao estabelecido em plano amostral constante na legislação específica.

3.3.Amostra representativa: é a amostra constituída por um determinado número de unidades amostrais estabelecido de acordo com o plano de amostragem.

3.4.Matéria-prima alimentar: toda substância de origem vegetal ou animal, em estado bruto, que para ser utilizada como alimento precise sofrer tratamento e/ou transformação de natureza física, química ou biológica.

3.5.Produto semi-elaborado: são aqueles produtos que serão submetidos a outras etapas de processamento industrial que não impliquem em transformação de sua natureza.

3.6.Alimentos comercialmente estéreis: alimentos processados em embalagens herméticas, estáveis à temperatura ambiente.

3.7.Unidade amostral: porção ou embalagem individual que se analisará, tomado de forma totalmente aleatória de uma partida como parte da amostra geral.

4. REFERÊNCIAS

4.1. BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 12/10/69. Institui Normas Básicas sobre Alimentos.

4.2. BRASIL. Lei nº 6437, de 24 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá providências.

4.3. BRASIL. Portaria nº1428, de 26/11/93. Aprova Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de dezembro de 1993. Seção 1, pt.1.

4.4. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 326, de 30/07/1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de agosto de 1997. Seção 1, pt.1.

4.5.Codex Alimentarius Commission - Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods CAC/GL 21 -1997

5.PROCEDIMENTOS E INSTRUÇÕES GERAIS

5.1. As metodologias para amostragem, colheita, acondicionamento, transporte e para análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (I.C.M.S.F.); "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" e "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" da American Public Health Association (APHA); "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration, editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC), em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas.

5.1.1. Caso sejam utilizados outros métodos laboratoriais, ou suas modificações, que não estejam referendados nos dispostos indicados no item 5.1., os mesmos devem ser validados por estudos comparativos intra e inter laboratoriais que certifiquem que os resultados obtidos por seu uso sejam equivalentes aos das metodologias citadas. Os registros dos processos de validação das metodologias também devem estar disponíveis sempre que necessário e devem cumprir com os expostos em 5.1.

5.2. Deve-se proceder a colheita de amostras dos alimentos em suas embalagens originais não violadas, observando a quantidade mínima de 200g ou 200mL por unidade amostral. Quando se tratar de produtos a granel, ou de porções não embaladas na origem, deve-se cumprir as Boas Práticas de Colheita constantes nas referências do item 5.1., respeitando-se a quantidade mínima necessária. Aceitam-se exceções para os casos relacionados a elucidação de DTA, e de rastreamento de microrganismos patogênicos. No caso de investigação de DTA devem ser colhidas as sobras dos alimentos efetivamente consumidos pelo(s) afetado(s).

5.2.1. No caso de alimentos comercialmente estéreis, cada unidade da amostra indicativa deve ser composta de no mínimo 3 (três) unidades do mesmo lote, para fins analíticos. Da mesma forma, quando se tratar da aplicação do plano de amostragem estatística, deve-se efetuar a colheita de, no mínimo, 3 conjuntos de unidades amostrais.

5.3. Dispensa-se a colheita da amostra sempre que o produto estiver alterado e ou deteriorado.

Entende-se por produto alterado ou deteriorado o que apresenta alteração(ões) e ou deterioração(ões) físicas, químicas e ou organolépticas, em decorrência da ação de microrganismo e ou por reações químicas e ou físicas.

5.3.1. Nestes casos, as intervenções legais e penalidades cabíveis não dependem das análises e de laudos laboratoriais. Excetuam-se os casos em que a amostra estiver implicada em casos de DTA para rastreamento de microrganismos patogênicos ou toxinas.

5.4. As amostras colhidas para fins de análise de controle e fiscal devem atender aos procedimentos administrativos estabelecidos em legislação específica.

5.5. A amostra deve ser enviada ao laboratório devidamente identificada e em condições adequadas para análise, especificando as seguintes informações: a data, a hora da colheita, a temperatura (quando pertinente) no momento da colheita e transporte, o motivo da colheita, a finalidade e o tipo de análise, as condições da mesma no ponto da colheita e outros dados que possam auxiliar as atividades analíticas.

5.5.1. Na emissão do laudo analítico, a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas devem seguir o disposto.

5.6. No laboratório, a amostra é submetida à inspeção para avaliar se apresenta condições para a realização da análise microbiológica. Nas seguintes situações, a análise não deve ser realizada, expedindo-se laudo referente à condição da amostra:

a) quando os dados que acompanham a amostra revelarem que a mesma, no ponto de colheita, se encontrava em condições inadequadas de conservação ou acondicionamento;

b) quando a amostra embalada apresentar sinais de violação;

c) quando a amostra não embalada na origem tiver sido colhida e ou acondicionada e ou transportada em condições inadequadas;

d) quando a amostra apresentar alterações ou deterioração visível;

e) quando a identificação da amostra não cumprir com o disposto no item 5.5. destes Procedimentos e Instruções Gerais.

5.6.1. Exceções são aceitas quando a amostra estiver implicada em casos de DTA para rastreamento de microrganismos patogênicos ou toxina. A amostra deve vir acompanhada de relatório adicional com informações que permitam direcionar a determinação analítica pertinente.

5.7. Para fins analíticos, os padrões microbiológicos descritos no Anexo I deste Regulamento referem-se aos resultados de análise de alíquotas obtidas da amostra, de acordo com as referências que constam do item 5.1 deste Regulamento.

5.8. Planos de amostragem

5.8.1. Para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se:

a) m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

b) M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis

c) n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

d) c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

5.8.2. Tipos de plano

a) Duas classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável ou inaceitável, em função do limite designado por M, aplicável para limites qualitativos.

b) Três classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável, em função dos limites m e M. Além de um número máximo aceitável de unidades de amostra com contagem entre os limites m e M, designado por c. As demais unidades, n menos c, devem apresentar valores menores ou iguais a m. Nenhuma das unidades n pode apresentar valores superiores ao M.

5.8.3. Situações de aplicação dos planos de amostragem:

5.8.3.1. Para os produtos relacionados do presente Regulamento no caso de avaliação de lotes e ou partidas, adotam-se os planos estatísticos mínimos (planos de três classes), conforme constam no referido.

5.8.3.2. Nos casos onde o plano estatístico mencionado no item anterior não conferir a proteção desejada, devidamente justificada, pode-se recorrer a complementação de amostra, conforme as referências indicadas no item 5.1. destes Procedimentos.

5.8.3.3. Quando nos pontos de venda ou de qualquer forma de exposição ao consumo, o lote ou partida do produto alimentício estiver fracionado ou de alguma forma não disponível na sua totalidade ou quando o número total de unidades do lote for igual ou inferior a 100 (cem) unidades, ou ainda, o produto estiver a granel, pode-se dispensar a amostragem estatística e proceder a colheita de uma amostra indicativa, aplicando-se o plano de duas classes.

5.8.3.4. Quando da existência do plano de duas classes onde o c igual a zero, o resultado positivo de uma amostra indicativa é interpretado para todo o lote ou partida. O mesmo se aplica quando for detectada a presença de toxinas em quantidades suficientes para causar doença no consumidor.

5.9. Considerações sobre os grupos de microrganismos pesquisados

5.9.1. A denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes". Caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico.

5.9.2. A determinação de clostrídio sulfito redutor a 46°C tem por objetivo a indicação de *Clostridium perfringens*. Caso seja determinada a presença de *C.perfringens*, deve constar o resultado no laudo analítico. Este critério consta como "C.sulfito redutor a 46°C" .

Nota: No que se refere à metodologia para clostrídios sulfito redutores a 46⁰C, adotam-se os meios de cultura para isolamento de *Clostridium perfringens* dos textos constantes no item 3.1. destes Procedimentos. São caracterizados por bactérias do grupo clostrídio sulfito redutor as que apresentarem desenvolvimento de colônias sulfito redutoras a 46⁰C por 24 horas; anaeróbios; bastonetes Gram positivos.

5.9.3. A enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e quando necessário, a de toxina estafilocócica das cepas isoladas podem ser realizadas a fim de se obter de dados de interesse à saúde pública. Este critério consta como "Estaf.coag.positiva" no Anexo I do presente Regulamento.

5.9.4. A determinação de *Pseudomonas aeruginosa* consta como *P.aeruginosa* nos padrões específicos constantes no Anexo I.

5.9.5. A determinação de *Vibrio parahaemolyticus* consta como *V. parahaemolyticus* nos padrões específicos constantes no Anexo I.

5.9.6. Quando os resultados forem obtidos por contagem em placa, estes devem ser expressos em UFC/ g ou mL (Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro). Da mesma forma, devem indicar NMP/ g ou mL (Número Mais Provável por grama ou mililitro), quando forem obtidos por esta metodologia.

5.9.7. Nos padrões constantes no Anexo I, a abreviatura "aus" significa "ausência". A abreviatura "pres" significa "presença". O símbolo "<" significa "menor que".

5.9.8. O resultado da determinação de *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* deve ser expresso como Presença ou Ausência na alíquota analisada. No Anexo I, estes microrganismos constam, respectivamente, como *Salmonella* sp e L. monocytogenes.

5.9.9. Quando da elucidação de DTA, os resultados devem especificar o número de células viáveis do microrganismo agente da doença, conforme informações e metodologias constantes nas referências citadas no item 5.1. destes Procedimentos. Os valores estabelecidos para os padrões microbiológicos de cada grupo de alimento constantes no Anexo I não se aplicam para o diagnóstico de caso/surto de DTA.

5.9.10. Em situações de risco epidemiológico que justifique um ALERTA SANITÁRIO, podem ser realizadas outras determinações não incluídas nos padrões estabelecidos, em função do problema ou aplicado plano de amostragem mais rígido conforme I.C.M.S.F.

ANEXO I

Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos

1. A tolerância é máxima e os padrões são mínimos para os diferentes grupos de produtos alimentícios, constantes no presente anexo, para fins de registro e fiscalização de produtos alimentícios. Estes limites e critérios podem ser complementados quando do estabelecimento de

programas de vigilância e rastreamento de microrganismos patogênicos e de qualidade higiênica e sanitária de produtos (consultar Princípios e Procedimentos Gerais e os Anexos II).

2. No caso de análise de produtos não caracterizados nas tabelas especificadas neste Anexo, considera-se a similaridade da natureza e do processamento do produto, como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar, constante no referido Anexo I deste Regulamento.

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
22 PRATOS PRONTOS PARA O CONSUMO (ALIMENTOS PRONTOS DE COZINHAS, RESTAURANTES E SIMILARES)						
a) a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos	Coliformes a 45°C/g	2x10	5	2	10	2x10
a)	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
a)	<i>B.cereus</i> /g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
a)	C.sulf.redutor a 46°C/g (específico para produtos à base de carnes)	10 ³	5	2	2x10 ²	10 ³
a)	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²
a)	Estaf.coag.positiva/g	5x10 ³	5	3	10 ²	5x10 ³

a)	<i>V.parahaemolyticus</i> (específico para produtos à base de pescados)	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella sp/25g</i>	Aus	5	0	Aus	-
c) sopas, caldos e molhos cozidos	Coliformes a 45°C/g	10	5	2	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>B.cereus/g</i>	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	C.sulf.redutor a 46°C/g (específico para produtos à base de carnes)	10 ³	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella sp/25g</i>	Aus	5	0	Aus	-
d) a base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	10	10 ²
	Estaf.coag.positiva/g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
		10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³

	<i>B.cereus/g</i>					
		Aus	5	0	Aus	-
	<i>Salmonella sp/25g</i>					
d) a base de verduras e legumes crus, temperados ou não, em molho ou não	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	5x10	10 ²
		Aus	5	0	Aus	-
	<i>Salmonella sp/25g</i>					
e) a base de verduras, legumes, raízes, tubérculos e similares, cozidos, temperados ou não	Coliformes a 45°C/g	5x10	5	2	10	5x10
		10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	Estaf.coag.positiva /g					
		10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>B.cereus/g</i>					
		Aus	5	0	Aus	-
	<i>Salmonella sp/25g</i>					
f) saladas adicionadas de molho de maionese e similares	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	5x10	10 ²
		10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	Estaf.coag.positiva /g					
		Aus	5	0	Aus	-
	<i>Salmonella sp/25g</i>					
h) doces e sobremesas tipo caseiro, não industrializados, excluídas as frutas frescas não	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	5x10	10 ²

manipuladas						
	Estaf.coag.positiva /g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>B.cereus</i> /g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
i) pastas preparadas para canapés e sanduíches	Coliformes a 45°C/g	10 ²	5	2	5x10	10 ²
	Estaf.coag.positiva /g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>B.cereus</i> /g	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	C.sulf.redutor a 46°C/g (específico para produtos à base de carnes)	10 ³	5	2	5x10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
FRUTAS, PRODUTOS DE FRUTAS e SIMILARES						
a) morangos frescos e similares, "in natura", inteiras, selecionadas ou não.	Coliformes a 45°C/g	2x10 ³	5	2	2 x 10 ²	2x10 ³
	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) frescas, "in natura",		5x10 ²	5	2	10 ²	5x10 ²

preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	Coliformes a 45°C/g					
	<i>Salmonella</i> sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

- Os pesquisadores envolvidos se colocam a disposição para responder qualquer dúvida a qualquer hora;
- Em uma parte do nosso trabalho, queríamos passar um cotonete umedecido nas mãos e na entrada do nariz das senhoras. A participação das senhoras na nossa pesquisa não vai causar nenhum problema ou tipo de ferimento ou dor. O algodão que passaremos nas mãos e nariz das senhoras é estéril, ou seja, nunca foi usado e está limpo, sem bactérias;
- Em qualquer momento do nosso trabalho, as senhoras podem desistir e não querer mais participar da pesquisa. Se as senhoras não quiserem, não passaremos o algodão em suas mãos e nariz;
- Nenhuma informação da pesquisa será divulgada nos jornais, televisão ou rádio. As senhoras não precisam falar o nome de vocês. A gente também não vai anunciar o nome da creche. Vamos chamá-la de A, B, C, D ou E. Dessa maneira, ninguém vai saber que as senhoras participaram da pesquisa;
- As senhoras não vão passar por nenhuma situação de constrangimento ou de vergonha; As senhoras não vão gastar nenhum dinheiro participando da nossa pesquisa;
- Vamos deixar uma cópia desta carta para cada uma das senhoras.
- Quaisquer dúvidas que as senhoras tenham depois da nossa visita, podem entrar em contato com a gente, nos telefones e endereços abaixo.

Endereço dos pesquisadores: Rua Monteiro Lobato, nº80. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. Laboratório de Toxinas Microbianas, UNICAMP, Campinas – SP. Telefone: (19) 3521 – 4012. e-mail: chaves@fea.unicamp.br

Para denúncias e/ou reclamações referentes aos aspectos éticos da pesquisa, entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa/FCM/UNICAMP
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. CEP 13083-887 Campinas-SP
Telefone: (19) 3521 – 8936 ou 3521 – 7187. e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Rubrica

Assinatura

Pesquisador:
Responsável pela creche
Sujeito de pesquisa:

Pesquisador: _____
Responsável pela creche: _____
Sujeito de pesquisa: _____

Campinas, de de 2012.