

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Newton Takeshi Okuno

**QUEIJOS MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO: PESQUISA DE *Stenotrophomonas maltophilia* E DE *Pseudomonas
aeruginosa***

Rio de Janeiro/RJ

2016

Newton Takeshi Okuno

**QUEIJOS MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO: PESQUISA DE *Stenotrophomonas maltophilia* E DE *Pseudomonas
aeruginosa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro/RJ

2016

Newton Takeshi Okuno

QUEIJOS MINAS FRESVAL COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO: PESQUISA DE *Stenotrophomonas maltophilia* E DE *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Victor Augustus Marin
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dra. Maria Gabriela Bello Koblitz
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família e aos meus amigos pelo apoio, mesmo com a distância geográfica.

Ao prof. Victor pela orientação do trabalho acadêmico, confiança e ensinamento, além de discussão de vários outros temas relevantes.

Às professoras Mariana e Gabriela pelo auxílio e instrução no estágio docência.

Aos colegas de mestrado pelas conversas e discussões sobre o mundo acadêmico.

Aos colegas de laboratório Cris, Isabela, Renata, Ana e Juliana pela troca de experiências.

Ao Fernando e à Cris pelo auxílio no laboratório.

Aos técnicos administrativos Andréia, Beth, Matheus, Milton, Rafaela e Viviane pela amizade.

À UNIRIO, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, pela oportunidade de realizar este trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao DNPM por autorizar a licença para tratar de assuntos particulares.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

七転び八起き - *Nana korobi ya oki*

“Caia sete vezes e levante oito”

Autor desconhecido

RESUMO

A população classificada como altamente vulnerável, em especial os neutropênicos, são indivíduos com maior susceptibilidade às doenças de origem alimentar. No entanto, ainda não existe consenso sobre a eficácia da dieta neutropênica e tampouco sobre as prescrições e as liberações de determinados grupos de alimentos, entre eles, o queijo fresco. O queijo Minas frescal é um queijo fresco, pronto para consumo logo após a sua fabricação, e, por suas características de umidade e composição, é um alimento altamente perecível. Ainda que as análises microbiológicas do queijo indiquem que este esteja de acordo com as normas legais, existe o risco para a população altamente suscetível da ingestão de microrganismos patógenos oportunistas como a *Stenotrophomonas maltophilia* e a *Pseudomonas aeruginosa* em níveis não controlados, uma vez que não há previsão da avaliação desses microrganismos em queijo nas normas sanitárias. A importância clínica de *S. maltophilia* e *P. aeruginosa* tem sido reconhecida por serem relevantes microrganismos patógenos oportunistas presentes em infecções nosocomiais, isoladas frequentemente em hemoculturas e amostras do trato respiratório, podendo causar pneumonia e sepse, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Os isolados clínicos costumam ainda apresentar multirresistência a antibióticos, capacidade de formação de biofilmes e facilidade em obter genes por transferência horizontal de genes. No período de maio/2015 a janeiro/2016 foram visitados 24 estabelecimentos comerciais formais no município do Rio de Janeiro e foram obtidas 39 medições de temperatura para fins de coleta, sendo que a maior parte dos produtos (84,6%) se encontrava em temperaturas de até 8 °C, indicando um controle razoável da temperatura pelos estabelecimentos visitados. Utilizou-se o método molecular da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar a *P. aeruginosa* nas amostras. Os protocolos de PCR para detecção de *S. maltophilia* se apresentaram inadequados para o estudo devido à suas baixas especificidades e possíveis resultados falso-positivos. A *P. aeruginosa* foi detectada por PCR em 4 de 33 (12,1%) queijos Minas frescal comercializados no município do Rio de Janeiro, confirmando o risco para a saúde da população suscetível.

Palavras-chave: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pseudomonas aeruginosa*. queijo Minas frescal. dieta neutropênica.

ABSTRACT

The highly vulnerable population, particularly those in a neutropenic state, is composed of individuals with greater susceptibility to foodborne illness. However, there is still no consensus on the effectiveness of the neutropenic diet, neither its requirements nor the release of consumption of certain groups of food, for example, fresh cheese. The *Minas frescal* cheese is a fresh cheese, ready for consumption shortly after its manufacture, and due to its characteristics of moisture and composition it is a highly perishable food. Poor microbiological quality is not rare in these cheeses and is usually originated from the production and worsened by poor storage conditions. Even if the cheese's microbiological analysis shows it is in compliance with the legal norms, there is a risk of intake by the highly susceptible population of opportunistic pathogenic microorganisms, as *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa*, in uncontrolled levels, since there is no evaluation for these microorganisms in cheese in the legal norms. The clinical importance of *S. maltophilia* and *P. aeruginosa* has been recognized due to their being relevant opportunistic pathogens microorganisms in nosocomial infections, often isolated in blood cultures and samples of the respiratory tract and they may cause pneumonia and sepsis, particularly in immunocompromised patients. Furthermore, clinical isolates usually present multidrug resistance to antibiotics, ability to form biofilm and ease in obtaining genes through horizontal gene transfer. From May 2015 to January 2016 twenty-four retail stores in Rio de Janeiro city have been visited, obtaining 39 temperature measurements. Most of the products (33/39) were at temperatures of up to 8 °C, indicating an acceptable temperature control by the stores visited. The molecular method PCR was used to identify *P. aeruginosa* in samples. The PCR protocols for *S. maltophilia* detection were unsuitable for this study due to their low specificity and the chance of false-positive results. *P. aeruginosa* was detected by PCR in 4 of 33 *Minas frescal* cheeses sold in Rio de Janeiro city, confirming the risk to the health of the susceptible population.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pseudomonas aeruginosa*. *Minas frescal* cheese. low bacterial diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico de produção de queijo no Brasil – 1999 a 2014 (vermelho) e previsão até 2020 (azul).....	5
Figura 2: Gráfico de consumo per capita anual de queijo no Brasil - 1999 a 2014 (vermelho) e previsão até 2020 (azul).....	5
Figura 3: Colônias típicas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em meio ágar Cetrimide .	27
Figura 4: Observação das colônias de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 em ultravioleta .	27
Figura 5: Gel de eletroforese dos produtos da PCR de <i>S. maltophilia</i>	35
Figura 6: Gel de eletroforese dos produtos da PCR - <i>P. aeruginosa</i>	38
Figura 7: Fluxograma de Produção de Queijo Minas Frescal.....	77
Figura 8: Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização dos produtos (n=39).....	79
Figura 9: Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização das amostras (n=33).....	80
Quadro 1: Medições das temperaturas de comercialização.....	33
Quadro 2: Quadro comparativo entre a RDC ANVISA nº 12/2001 e a Portaria MAPA nº 146/1996	78
Quadro 3: Verificação de especificidade de pares de primer de Gallo et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016	81
Quadro 4: Verificação de especificidade de pares de primer de Whitby et al. (2000) - Primer-BLAST – 31/03/2016	83
Quadro 5: Verificação de especificidade de pares de primer de Choi et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Locais ou produtos com identificação positiva de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	22
Tabela 2: Locais ou produtos com identificação positiva de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Tabela 3: Protocolos de PCR - <i>primers</i>	29
Tabela 4: Protocolos de PCR - tempos e temperaturas	29
Tabela 5: Protocolos de PCR – concentrações/volumes de reagentes.....	29
Tabela 6: Análise estatística - Prazos de validade (marca) e tempo entre a análise e a fabricação (amostras).....	32
Tabela 7: Análise estatística - Temperaturas de comercialização.....	34
Tabela 8: Análise de especificidade de primers <i>in silico</i> - <i>S. maltophilia</i> – 31/03/2016	34
Tabela 9: Análise de especificidade de primers <i>in silico</i> - <i>P. aeruginosa</i> – 31/03/2016	36
Tabela 10: Análise de especificidade de primers <i>in silico</i> – <i>Pseudomonas</i> spp. – 14/05/2016	36
Tabela 11: Resultados da detecção por PCR	36
Tabela 12: Dados de aquisição das amostras positivas para <i>P. aeruginosa</i>	37
Tabela 13: Dados de trabalhos de identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. em queijos .	45
Tabela 14: Detalhamento de trabalhos de identificação de <i>Pseudomonas</i> spp. em queijos	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CISA	Comissão Interministerial de Saúde e Agricultura
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GN	Gram negativo
HTST	Alta temperatura, curto tempo
IN	Instrução Normativa
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LACEN	Laboratório Central
MA	Ministério da Agricultura
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multirresistente a antibióticos
MS	Ministério da Saúde
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDR	Pan-resistente a antibióticos
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
VBNC	Viável, mas não cultivável
XDR	Extensivamente resistente a antibióticos

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 A SEGURANÇA DOS ALIMENTOS E A POPULAÇÃO DE IMUNOCOMPROMETIDOS	1
1.2 QUEIJO MINAS FRESCAL	4
1.2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO	4
1.2.2 CARACTERÍSTICAS	5
1.2.3 O PROBLEMA DA TEMPERATURA	7
1.2.4 MICROBIOLOGIA GERAL.....	8
1.3 BASTONETES GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES.....	11
1.3.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.3 INTERAÇÕES ENTRE <i>S. maltophilia</i> E <i>P. aeruginosa</i>	15
1.3.4 <i>S. maltophilia</i> E <i>P. aeruginosa</i> NA ÁREA CLÍNICA.....	16
1.3.5 <i>S. maltophilia</i> E <i>P. aeruginosa</i> NA ÁREA DE ALIMENTOS.....	18
2 OBJETIVOS	24
2.1 GERAL	24
2.2 ESPECÍFICOS.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	25
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	26
3.3 CULTURA EM PLACAS	26
3.4 COLETA DAS COLÔNIAS	26
3.4.1 <i>S. maltophilia</i>	26
3.4.2 <i>P. aeruginosa</i>	27

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA	28
3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	29
3.7 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE	30
3.8 VERIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DA ESPECIFICIDADE DOS PARES DE <i>PRIMER</i> ...	30
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS	32
4.1 DADOS GERAIS E LEVANTAMENTO DE TEMPERATURA DE COMERCIALIZAÇÃO	32
4.2 <i>S. maltophilia</i>	34
4.3 <i>P. aeruginosa</i>	35
5 DISCUSSÃO	39
5.1 DADOS GERAIS E LEVANTAMENTO DE TEMPERATURA DE COMERCIALIZAÇÃO	39
5.2 <i>S. maltophilia</i>	41
5.3 <i>P. aeruginosa</i>	43
6 CONCLUSÃO	50
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A – Fluxograma de Produção de Queijo Minas Frescal	77
APÊNDICE B – Quadro comparativo entre a RDC ANVISA nº 12/2001 e a Portaria MAPA nº 146/1996	78
APÊNDICE C – Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização dos produtos (n=39)	79
APÊNDICE D – Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização das amostras (n=33)	80
APÊNDICE E – Verificação de especificidade de pares de primer de Gallo et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016	81

APÊNDICE F – Verificação de especificidade de pares de <i>primer</i> de Whitby et al. (2000) - Primer-BLAST – 31/03/2016.....	83
APÊNDICE G – Verificação de especificidade de pares de <i>primer</i> de Choi et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016.....	87

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A SEGURANÇA DOS ALIMENTOS E A POPULAÇÃO DE IMUNOCOMPROMETIDOS

A saúde é um direito social, “garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação” (BRASIL, 1988, art. 196º). A vigilância sanitária pode ser entendida como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1990, art. 6º, §1º). As ações da vigilância sanitária assumem fundamental importância para a população classificada como altamente vulnerável/suscetível.

Essa população é composta por indivíduos com maior risco de contrair doenças de origem alimentar, como os que recebem alimentação em centros de detenção, centros de saúde, creches, casas de repouso, centros de hemodiálise e hospitais (FDA, 2013); os idosos, crianças em idade pré-escolar e imunocomprometidos (FDA, 2013; GERBA; ROSE; HAAS, 1996; LUND; O'BRIEN, 2011); as gestantes e pessoas com deficiências nutricionais (GERBA; ROSE; HAAS, 1996; LUND; O'BRIEN, 2011).

O grupo dos imunocomprometidos é composto por pessoas com imunodeficiências primárias, pelos transplantados que utilizam imunossuppressores, pelos pacientes em tratamentos quimio e radioterápicos, pelos leucêmicos, pelos acometidos por cirrose hepática e pelos portadores de doenças do sistema imune e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA (LUND; O'BRIEN, 2011). Os imunocomprometidos, principalmente os com contagem de neutrófilos abaixo de $1.500 \text{ células/mm}^3$, que caracteriza um estado neutropênico, devem estar sempre atentos quanto à origem, manipulação e armazenamento dos alimentos, devendo seguir as recomendações dos profissionais da saúde, uma vez que a neutropenia tem repercussões graves na saúde do indivíduo devido à predisposição às infecções oportunistas e de doenças severas de origem alimentar (LUND; O'BRIEN, 2011; MEDEIROS et al., 2004).

Uma das formas utilizadas para reduzir o risco de infecções de origem alimentar é utilização da dieta neutropênica, cujo real efeito sobre o estado de saúde de pacientes ainda não é conhecido (BOYLE et al., 2014; GARÓFOLO, 2013; LUND; O'BRIEN, 2011; LUND, 2014; MODESTO; LOPES; NÓBREGA, 2010; SILVA et al., 2011b; SONBOL et al., 2015; VAN DALEN et al., 2012).

De acordo com a meta-análise de Van Dalen et al. (2012), não foi possível chegar a conclusões definitivas sobre o real efeito da dieta neutropênica com as evidências até então disponíveis, devido às limitações metodológicas dos estudos de Moody et al. (2006), Van Tiel et al. (2007) e Gardner et al. (2008). Além disso, Van Dalen et al. (2012) frisam que a ausência de evidências de efeito não deve ser entendida como uma evidência de ausência de efeito.

O estudo de Trifilo et al. (2012) encontrou um risco aumentado para infecção ao se prescrever uma dieta neutropênica para pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, principalmente após a resolução da neutropenia; a mortalidade, no entanto, foi similar entre o grupo transplantado e o controle. A meta-análise de Sonbol et al. (2015) abrangeu os estudos de Moody et al. (2006), Van Tiel et al. (2007), Gardner et al. (2008) e Trifilo et al. (2012), e não encontrou nenhuma superioridade ou vantagem da dieta neutropênica, quanto à mortalidade ou infecção, para uma dieta regular.

Para obter conclusões definitivas a respeito da efetividade da dieta neutropênica são necessários estudos de melhor qualidade que utilizem ensaios clínicos randomizados (SONBOL et al., 2015; VAN DALEN et al., 2012) com uma população de estudo mais homogênea e com maior número de pacientes incluídos (MODESTO; LOPES; NÓBREGA, 2010; SILVA et al., 2011b; SONBOL et al., 2015; VAN DALEN et al., 2012). Além disso, os estudos da qualidade microbiológica dos alimentos devem ser encorajados, pois fornecem suporte para a avaliação da segurança dos alimentos (BOYLE et al., 2014; LUND; O'BRIEN, 2011; LUND, 2014; MODESTO; LOPES; NÓBREGA, 2010).

O Consenso de Nutrição Oncológica do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), por sua vez, considera um estado neutropênico a contagem de neutrófilos menor ou igual a $1.000 \text{ células/mm}^3$, e a conduta terapêutica nutricional para pacientes oncológicos visando o tratamento de sinais e sintomas de neutropenia é dividida em paciente adulto e pediátrico (INCA, 2015).

As orientações para os adultos incluem:

Higienizar frutas e verduras cruas com sanitizantes [...]; utilizar água potável filtrada, fervida ou mineral de boa procedência para o consumo; utilizar oleaginosas e grãos somente coccionados; dar preferência para os alimentos como frutas, verduras e legumes sempre coccionados; utilizar leites e derivados somente pasteurizados e esterilizados (não utilizar iogurtes e leite fermentados); utilizar carnes e ovos somente bem coccionados; utilizar alimentos processados em embalagens individuais e dentro do prazo de validade; não utilizar brotos de vegetais e sementes germinadas; não usar probióticos [...]. (INCA, 2015).

E para os pacientes pediátricos há uma maior restrição:

Não se recomenda o uso de probióticos; higienizar, antes do consumo, todas as frutas e verduras com sanitizantes; utilizar água potável, fervida ou mineral em embalagens não reutilizáveis; ingerir condimentos e grãos somente cozidos; ingerir leite esterilizado ou pasteurizado e derivados somente pasteurizados; ingerir carnes e ovos somente bem cozidos; não consumir oleaginosas (castanhas, amêndoas, nozes); não consumir chás em sachês ou de folhas secas, nem fervidos; utilizar preparações produzidas por estabelecimentos que tenham todos os cuidados adequados à segurança alimentar; preferir consumir os alimentos industrializados (biscoitos, sucos líquidos, iogurtes, etc.) em embalagens para consumo individual imediato; evitar carnes industrializadas; preferir alimentos processados em embalagens individuais. (INCA, 2015).

Não há, no entanto, um consenso global dos profissionais em relação aos alimentos recomendados e tampouco ao tempo de liberação da dieta neutropênica para os pacientes em período de imunossupressão, sendo essencial e urgente a harmonização dos protocolos (BRAUN; CHEN; FRANGOUL, 2014; CARR; HALLIDAY, 2015; LUND, 2014; MCGEENEY; GATISS, 2014; VICENSKI; ALBERTI; AMARAL, 2012).

Ainda que não haja conclusão do efeito da dieta neutropênica, uma vez que as consequências de infecções de origem alimentar podem ser severas e fatais para a população vulnerável, é importante que se considere a prudência em reduzir o risco de doença ao manter a restrição a alimentos com alto risco de infecção durante o período de neutropenia (LUND, 2014; SILVA et al., 2011b). Os pacientes estão submetidos a caros e complexos tratamentos, não havendo sentido em expô-los a alimentos que possam conter patógenos enquanto alimentos saudáveis e com menor risco de contaminação estão igualmente disponíveis (LUND; O'BRIEN, 2011; LUND, 2014).

Vicenski; Alberti; Amaral (2012) observaram divergências entre prescrições de profissionais em relação aos alimentos permitidos aos pacientes durante o período de imunossupressão, sendo que a maioria de 17 centros brasileiros de transplante de medula óssea recomendava a dieta neutropênica para pacientes em período crítico de imunossupressão, havendo variação entre protocolos nutricionais de diferentes centros. Apenas sete centros possuíam uma área exclusiva para preparação das refeições para pacientes imunossuprimidos e somente nove possuíam trabalhadores que trabalhavam exclusivamente com o preparo e distribuição dos alimentos. Alguns centros permitiam que pacientes, no período crítico de imunossupressão, consumissem sem restrição os derivados lácteos: leite UHT / leite em pó / leite condensado pasteurizado (76%), iogurte pasteurizado (12%), queijo grelhado (18%), queijos pasteurizados - cheddar, muçarela, parmesão e *cream cheese* - (53%), e, surpreendentemente, leite fermentado (6%) e queijos frescos – queijo branco e ricota - (6%).

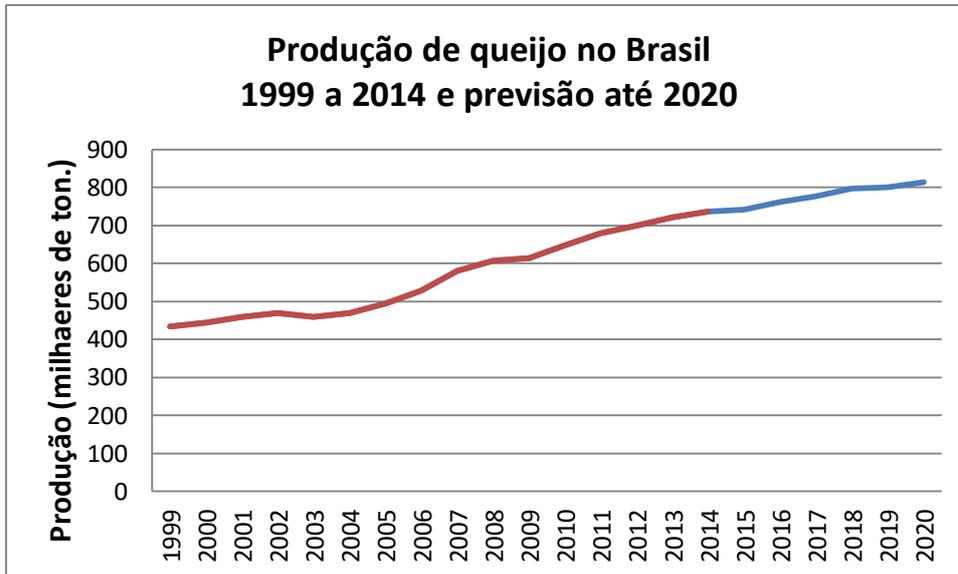
Aparentemente, mundialmente também não é incomum que nutricionistas autorizem derivados lácteos não pasteurizados em dietas neutropênicas (BRAUN; CHEN; FRANGOUL, 2014; MCGEENEY; GATISS, 2014). De acordo com a proposta de Lund (2014) para uma dieta com baixa contagem microbiana, os queijos frescos, e principalmente os feitos com leite cru, estariam classificados como de alto risco para a população suscetível.

1.2 QUEIJO MINAS FRESCAL

1.2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO

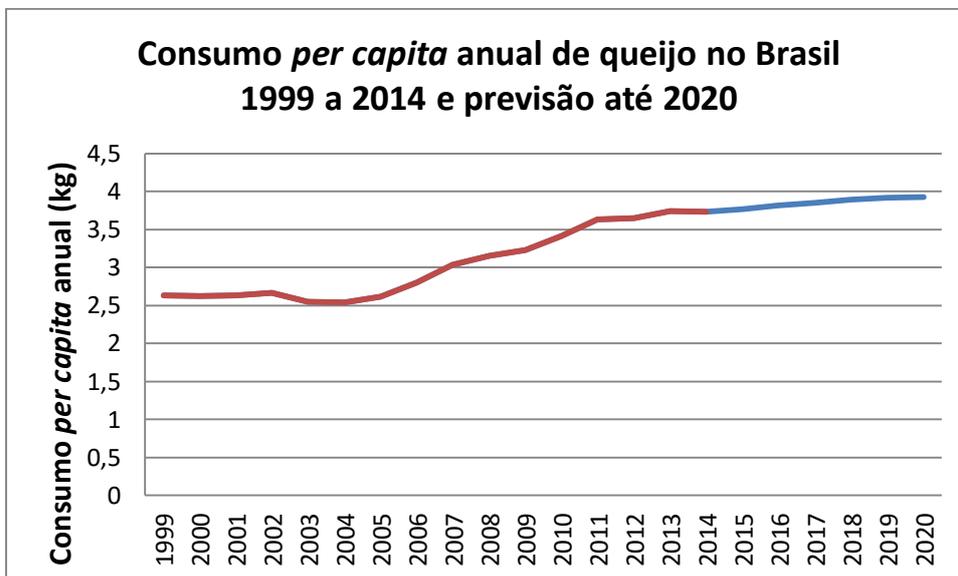
Nos últimos 15 anos, a produção brasileira de queijo apresentou crescimento contínuo, chegando ao patamar de 736 mil toneladas em 2014, com previsão de crescimento até 2020 (Figura 1). O consumo *per capita* também apresentou um crescimento nos últimos 15 anos, sendo em 2013 a quantidade de 3,74 kg com uma ligeira queda em 2014 para 3,73 kg e previsão de crescimento até 2020 (Figura 2).

Figura 1: Gráfico de produção de queijo no Brasil – 1999 a 2014 (vermelho) e previsão até 2020 (azul)



Fonte: OECD; FAO (2016)

Figura 2: Gráfico de consumo per capita anual de queijo no Brasil - 1999 a 2014 (vermelho) e previsão até 2020 (azul)



Fonte: OECD; FAO (2016)

1.2.2 CARACTERÍSTICAS

Pela legislação brasileira, a denominação “queijo” somente pode ser utilizada para produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea (BRASIL, 1996), sendo este definido como:

[...] o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. (BRASIL, 1996, Anexo 1, Item 2.1).

Por definição, o queijo Minas frescal é o queijo fresco, pronto para o consumo logo após a sua fabricação, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas, sendo a característica distintiva de seu processo de elaboração a obtenção de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada (BRASIL, 1996, 1997).

Os ingredientes obrigatórios são o leite e/ou leite reconstituído e o coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas. O leite deve ser pasteurizado ou submetido a tratamento térmico que assegure fosfatase residual negativa, combinando ou não com outros processos físicos e biológicos para que seja garantida a inocuidade do produto. Os ingredientes opcionais são o leite em pó, creme, sólidos de origem láctea, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e cultivo de bactérias lácteas específicas. O ácido láctico é permitido como aditivo com a função específica de regulador de acidez (BRASIL, 1996, 1997). Um fluxograma básico da produção de queijo Minas frescal é apresentado no Apêndice A.

Pela legislação brasileira, o queijo Minas frescal é classificado como semi-gordo, possuindo entre 45% e 59,9% de matéria gorda no extrato seco, e de muito alta umidade, com teor não inferior a 55% (BRASIL, 1996, 1997). A sua composição centesimal média é 17,4 g de proteína, 20,2 g de lipídios, 3,2 g de carboidratos e 3,0 g de cinzas por 100 g de parte comestível com teor de umidade médio de 56,1% (NEPA, 2011).

Magenis et al. (2014) observaram variações entre 50,07% e 74,49% de umidade, entre 23,12 g e 52,47 g de gordura em extrato seco e entre 12,71 g e 25,91 g de proteínas em 100 g de produto. Ricardo et al. (2011) observaram variações entre 34,66% e 68,96% de umidade e pH entre 5,20 e 6,78 em queijos artesanais e variações entre 55,0% e 69,9% de umidade e pH entre 5,26 e 6,48 em queijos industrializados. Carvalho; Viotto; Kuaye (2007) encontraram, em queijos

produzidos através de adição de cultura láctica, atividade de água média de $0,986 \pm 0,005$, umidade média de $57,3\% \pm 3,8\%$ e pH médio de $5,9 \pm 0,4$.

Tais características fazem do queijo Minas frescal um produto altamente perecível e a sua temperatura de armazenamento não deve ser superior a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme a Portaria MAPA nº 352, de 04 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997).

Os principais fatores de contaminação de queijos feitos com leite pasteurizado são: manipuladores, acondicionamento em ambiente contaminado, problemas na refrigeração, higienização inadequada de equipamentos e utensílios, contaminação cruzada com matéria-prima, matéria-prima contaminada com patógenos de origem animal ou ambiental, manutenção do produto à temperatura ambiente por várias horas e processamento térmico insuficiente (GOULD; MUNGAI; BARTON BEHRAVESH, 2014).

1.2.3 O PROBLEMA DA TEMPERATURA

O supermercado é o local onde a maior parte dos consumidores do Estado do Rio de Janeiro (76,4%) adquirem os queijos para próprio consumo (PLANZER et al., 2009) e os problemas na distribuição, armazenamento e comercialização dos queijos são importantes na questão microbiológica dos produtos.

Tanto o decreto municipal n. 6.235, de 30 de outubro de 1986, do município do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 1986) quanto o decreto estadual n. 6.538, de 17 de fevereiro de 1983, do Estado do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 1983) não definem a temperatura máxima de derivados de leite permitida nos locais de venda e a resolução federal CISA/MA/MS nº 10 (BRASIL, 1984), de 31 de julho de 1984, define a temperatura de até $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para alimentos resfriados. Deve-se, no entanto, lembrar que a temperatura de conservação de queijo Minas frescal é definida em até $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme Portaria MAPA nº 352/1997 (BRASIL, 1997).

O Programa de Análise de Produtos, sem caráter fiscalizatório, do INMETRO verificou em 2006 a conformidade de queijos Minas frescal e Minas padrão adquiridos no período entre outubro e novembro de 2005. As temperaturas dos produtos nos pontos de venda foram medidas, considerada como conforme para alimentos refrigerados pelo INMETRO a de $10 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando em 6 das 15 (60%) das amostras de queijo Minas frescal não conformes. Algumas vezes, a

especificidade de temperatura do queijo Minas frescal não é observada, e, caso a temperatura de 8 °C fosse considerada, a taxa de não conformidade com a temperatura subiria para 67% (INMETRO, 2006).

André; Sturion (2015) verificaram em 2014 a conformidade de queijos e derivados lácteos comercializados em varejões do município de Piracicaba/SP com os padrões de identidade e qualidade vigentes à época e identificaram não conformidades em aproximadamente 25% dos queijos Minas frescal, além disso, na avaliação geral dos diferentes derivados lácteos, a taxa de maior não conformidade foi referente à temperatura com elevados 83,9%.

1.2.4 MICROBIOLOGIA GERAL

No Brasil, os critérios e padrões microbiológicos para queijos são regulamentados tanto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da RDC nº 12/2001, quanto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Portaria nº 146/1996, como mostrado no Apêndice B. Cabe ressaltar que, para produtos de origem animal, a competência da fiscalização da produção primária, industrialização, armazenamento e distribuição é competência do MAPA e a competência da fiscalização da comercialização e consumo final é do Ministério da Saúde (GOMES, 2013).

Na análise microbiológica do INMETRO, 26,6% amostras apresentaram valores superiores ao permitido de coliformes termotolerantes, 13,3% apresentaram valores acima de estafilococos, 6,6% apresentaram valores acima de *Listeria* e nenhuma amostra apresentou contaminação por *Salmonella* (INMETRO, 2006).

Utilizando-se de dados e amostras coletadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN – DF, Nunes; Mota; Caldas (2013) observaram 33,3% (IC 95%: 27 – 40,1) de não conformidade microbiológica de queijo Minas frescal em amostras obtidas no período de 2000 a 2010.

Existem diversos estudos indicando não conformidades no quesito microbiológico do queijo Minas frescal com a legislação quanto a coliformes a 45 °C (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007; CARVALHO et al., 2009; INMETRO, 2006; OKURA; MOACIR, 2010; WOLUPECK et al., 2012; ZONTA et al., 2013), estafilococos coagulase positiva (APOLINÁRIO;

SANTOS; LAVORATO, 2014; CARVALHO et al., 2009; SANTOS; HOFFMANN, 2010; WOLUPECK et al., 2012), *Salmonella* sp. (CARVALHO et al., 2009; SILVA et al., 2011a; WOLUPECK et al., 2012), *Listeria monocytogenes* (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; BRITO et al., 2008; CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007; INMETRO, 2006) e coliformes a 35 °C (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; CARVALHO et al., 2009; WOLUPECK et al., 2012; ZONTA et al., 2013).

A variação da qualidade microbiológica do queijo em anos diferentes foi avaliada por Wolupeck et al. (2012), que compararam a qualidade de queijos Minas frescal adquiridos em Curitiba/PR em 1999 e 2009, observando uma menor contaminação microbiana nos queijos comercializados e avaliados em 1999 do que nos de 2009, que apresentaram elevada contagem de aeróbios mesófilos e ao menos um parâmetro microbiológico em desacordo com a legislação.

A evidência da importância do controle microbiológico da produção é relatada por Sangaletti et al. (2009), que avaliaram a vida-de-prateleira de queijo Minas frescal armazenado a 4 °C por 30 dias de três lotes de uma mesma marca. Os autores observaram o aumento da população de bactérias lácticas, psicrótróficas e mesófilas aeróbias com alterações de parâmetros físico-químicos como a redução do pH, aumento da concentração de ácido láctico, aumento das taxas de lipólise e proteólise. Ao 30º dia, verificaram desenvolvimento da população de *E. coli* em um dos lotes, o que tornou o produto impróprio para consumo.

Na RDC nº 12/2001, além do grupo “8.B – Queijos”, existe o grupo “26.B - alimentos para imunossuprimidos e imunocomprometidos, excluídos os que serão consumidos após adição de líquidos, com emprego de calor”, no qual, para uma amostra indicativa, deve apresentar ausência de *Salmonella* sp. em 25 g e de coliformes termotolerantes, máximos de 10 UFC/g de Estafilococos coagulase positiva, 5 x 10 UFC/g de bolores e leveduras e 5 x 10² UFC/g de *Bacillus cereus* (BRASIL, 2001). É importante observar que as normas legais vigentes englobam os principais microrganismos patógenos e não englobam os microrganismos patógenos oportunistas.

A investigação de surtos de origem alimentar pode auxiliar a ampliar a perspectiva da existência de outros agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos além dos que estão presentes na legislação. Surtos no período de 1998 a 2011, nos Estados Unidos, relacionados a queijos produzidos com leite

pasteurizado, foram causados por *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* produtora de toxina, *Shigella*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Norovirus* e outros vírus não identificados; e, no mesmo período, surtos relacionados a queijos produzidos com leite cru foram causados por *Salmonella*, *Campylobacter*, *Brucella*, *E. coli* produtora de toxina e *Shigella* (GOULD; MUNGAI; BARTON BEHRAVESH, 2014).

De 239 surtos reportados de gastroenterites relacionados ao consumo de derivados de leite no Estado de São Paulo, no período de 2000 a 2010, somente 33% tiveram o agente etiológico identificado. Dos identificados, 8,86% eram vírus, 2,54% eram parasitas, 2,54% eram substâncias químicas, 1,26% eram leveduras e 84,4% eram bactérias. O grupo das bactérias foi composto por *S. aureus* (23,9%), *E. coli* (16,4%), *Salmonella* (14,9%), *Shigella* (11,9%), *B. cereus* (9,0%), *Brucella* (1,5%), *Clostridium botulinum* (1,5%), *Pseudomonas* (1,5%), e outras enterobactérias (19,4%) (MERUSSI; MAFFEI; CATANOZI, 2012).

Okura; Moacir (2010) observaram, na região do Triângulo Mineiro, a presença de espécies de *Proteus*, *Providencia* e *Enterobacter* em queijos Minas frescal produzidos com leite pasteurizado, *Proteus*, *Providencia* e *Enterobacter*, *Serratia* e *Klebsiella* em queijos Minas frescal produzidos com leite cru, e *Proteus*, *Providencia* e *Enterobacter* em queijos temperados.

O gênero *Pseudomonas* spp., que está presente em uma diversidade de alimentos, é composto por várias espécies que podem apresentar crescimento em uma gama extensa de temperaturas e produzir enzimas com capacidade pectinolítica, amilolítica, lipolítica, proteolítica e fosfolipolítica (CALDERA et al., 2016). Tais características enfatizam a necessidade do controle de *Pseudomonas* spp. como microrganismos psicotróficos deteriorantes na cadeia de alimentos refrigerados (CALDERA et al., 2016).

Vithanage et al. (2014) identificaram que o gênero *Pseudomonas* (46%) era o gênero predominante na microbiota deteriorante de leite cru armazenado a 4 °C por 10 dias em Victoria, Austrália. A principal espécie identificada foi de *Pseudomonas fluorescens* (26%), mas outras espécies como *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis*, *Hafnia alvei*, *Rahnella aquatilis*, *Serratia liquefacens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter guillouiae*, grupo *B. cereus*, *Bacillus licheniformis*, grupo

Bacillus pumilus e *Bacillus horneckiae* também foram identificados em menores frequências.

Arslan; Eyi; Özdemir (2011) verificaram que as 32 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de queijos frescos artesanais da Turquia apresentavam baixas taxas de resistência a antimicrobianos, com resistência a penicilina G, suscetibilidade a amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, ceftazidima e imipenem, e resistência variável a trimetoprima sulfametoxazol, piperacilina e piperacilina-tazobactam.

1.3 BASTONETES GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES

As bactérias patogênicas oportunistas usualmente são de origem ambiental e com frequência apresentam um perfil de baixa susceptibilidade a antibióticos (MARTÍNEZ, 2014). Elas devem possuir condições de sobreviver às estritas condições físico-químicas do corpo humano como a faixa estreita de temperatura, de tensão de oxigênio e de pH, e a baixa disponibilidade de ferro e de alguns nutrientes específicos (MARTÍNEZ, 2014).

Os bastonetes Gram-negativos não fermentadores são microrganismos aeróbios, não esporulados, que são incapazes de realizar a fermentação de carboidrato, realizando a sua degradação pela via oxidativa, e são importantes patógenos oportunistas e nosocomiais de grande importância quando envolvidos com a saúde de pacientes imunocomprometidos (LEVY; GARCIA, 2010; RATTANAUMPAWAN et al., 2013).

Atualmente a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Acinetobacter baumannii* estão entre as bactérias mais isoladas em hemoculturas e amostras do trato respiratório em hospitais, e, ainda que a *Stenotrophomonas* spp. e o complexo *Burkholderia cepacia* representem um percentual mínimo de isolamento, estes também apresentam grande importância clínica, devido às suas intrínsecas multirresistências a antibióticos (LEVY; GARCIA, 2010; RATTANAUMPAWAN et al., 2013).

A prevalência dos microrganismos pode variar de acordo com a região. Oliveira et al. (2015) reportaram a *A. baumannii* como a bactéria Gram-negativa multirresistente com maior prevalência em um hospital universitário no Brasil, seguido pela *P. aeruginosa*. Vonberg et al. (2008) reportaram a *P. aeruginosa* como

sendo 40,2% do total de bactérias Gram-negativas multirresistentes isolados em um hospital universitário na Alemanha, seguido pela *S. maltophilia* com 27,2%.

1.3.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

A *S. maltophilia*, previamente conhecida como *Pseudomonas maltophilia* e *Xanthomonas maltophilia*, é um bastonete Gram-negativo aeróbio estrito com dimensões de aproximadamente 0,5 µm por 1,5 µm com motilidade por flagelos polares (HUGH; RYSCHENKOW, 1961; PALLERONI; BRADBURY, 1993). Não apresenta crescimento em pH 4,5, não é produtora de ácido a partir da lactose (HUGH; RYSCHENKOW, 1961) e se mantém viável na faixa de temperatura entre 4 °C e 37 °C (WILKINSON; KERR, 1998) com temperatura ótima de crescimento de 35 °C (PALLERONI; BRADBURY, 1993; TSUJI et al., 1982).

Atualmente não é possível realizar a distinção entre suas cepas patogênicas e não patogênicas e, mais preocupante, a *S. maltophilia* apresenta uma taxa de mutação, curiosamente elevada em isolados clínicos, que a permite ocupar novos nichos e hospedeiros (BERG; MARTINEZ, 2015).

De acordo com revisão realizada por Brooke (2012), as infecções de *S. maltophilia* são nosocomiais ou adquiridas na comunidade e são associadas às infecções do trato respiratório como a pneumonia e a exacerbação aguda da doença pulmonar obstrutiva crônica; à bacteremia; à sepse biliar; às infecções de ossos e articulações, trato urinário e tecidos moles; às infecções oftalmológicas como a endoftalmite, a queratite, a esclerite e a dacriocistite; à endocardite; e à meningite.

As infecções gastrointestinais aparentam não ser frequentes (DENTON; KERR, 1998), no entanto, uma colonização do intestino delgado resultando em enterite crônica grave foi reportada (HELLMIG et al., 2005). Conforme revisão sistemática feita por Falagas et al. (2009), uma taxa de mortalidade de até 37,5% pode ser atribuída à infecção pelo microrganismo.

Em uma investigação piloto, Apisarnthanarak et al. (2003) verificaram a prevalência de *S. maltophilia* em material fecal em 9,5% de 41 pacientes de uma unidade oncológica que desenvolveram diarreia, indicando a possibilidade do trato gastrointestinal ser uma fonte potencial para infecção sistêmica pelo microrganismo.

Algumas cepas apresentam a habilidade de internalização e réplica em células dendríticas imaturas derivadas de monócitos, as quais podem servir como vetores de disseminação fora da região de infecção (ROSCETTO et al., 2015).

Microrganismos que possuem elementos de resistência e fatores de virulência tem uma maior probabilidade de sobrevivência a tratamentos com antibióticos e a produzir infecção (BERG; MARTINEZ, 2015). A *S. maltophilia* possui um amplo perfil de resistência intrínseca e adquirida a antibióticos que inclui a presença de bombas de efluxo, β -lactamases, aminoglicosídeo fosfotransferase, N-aminoglicosídeo acetiltransferase e proteínas da família de pentapeptídeos repetidos (SÁNCHEZ, 2015).

Crossman et al. (2008) identificaram na cepa K279a a ocorrência de DNA adquirido por transferência horizontal de genes, elementos genéticos móveis, presença de genes de bombas de efluxo, que podem conferir resistência a antibióticos, genes de produção de fímbrias, as quais estão associadas com a adesão e formação de biofilme em superfícies, além de genes de resistência a diversos antibióticos, solventes orgânicos, peróxidos e metais pesados.

Os isolados clínicos possuem grandes variações internas de fenótipos e genótipos, apresentando habilidade de formar de biofilmes, não sendo ainda possível identificar o mecanismo molecular responsável por sua formação (ZHUO; ZHAO; XIAO, 2014). A sua capacidade de crescimento na forma de biofilme tem sido relacionada à sua elevada resistência aos antibióticos (WU et al., 2013).

O sistema de *quorum sensing* da *S. maltophilia*, o fator de sinal difusível, conhecido como DSF - ácido cis-11-metil-2-dodecenóico - $C_{13}H_{24}O_2$, está relacionado ao controle de sua virulência, motilidade, formação de biofilme, e resistência a antibióticos e metais pesados (HUEDO et al., 2015).

1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo, com dimensões de aproximadamente 0,2 a 0,6 μm por 1,2 μm , não produtor de ácido a partir de lactose, que apresenta motilidade por flagelo polar, se desenvolvendo em pH na faixa de 4,5 a 9,0 e na faixa de temperatura de 7 $^{\circ}\text{C}$ a 44 $^{\circ}\text{C}$, porém sem apresentar crescimento

em temperaturas de 0 °C a 5 °C ou acima de 44 °C (COLWELL, 1965) e com temperatura ótima de crescimento de 37 °C (TSUJI et al., 1982).

Dentre as principais infecções relacionadas à *P. aeruginosa* estão as infecções pulmonares, principalmente em portadores de fibrose cística, pneumonia (GELLATLY; HANCOCK, 2013; WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010), bronquiectasias de fibrose não cística, síndrome da bronquiolite obliterante (WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010), infecções do trato urinário (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MITTAL et al., 2009), otite externa, ceratite, otite média, foliculite, infecções dos tecidos moles, pé diabético (GELLATLY; HANCOCK, 2013), e bacteremia (GELLATLY; HANCOCK, 2013; KIM et al., 2014).

Uma infecção entérica ainda não profundamente entendida e pouco estudada é a febre de Xangai, que está associada à colonização por *P. aeruginosa* e afeta principalmente crianças, causando febre, diarreia, enterite necrosante e sepse (CHUANG et al., 2014).

A *P. aeruginosa* é um microrganismo reconhecidamente multirresistente aos antibióticos e possui uma terminologia padronizada internacionalmente para seus perfis de resistência em ordem crescente de resistência: multirresistente (MDR), extensivamente resistente (XDR) e pan-resistente (PDR) (MAGIORAKOS et al., 2012). A análise do perfil de resistência é feita com agentes com atividade anti-*Pseudomonas* dentro das categorias de aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas com inibidores de β -lactamase, monobactâmicos, ácidos fosfônicos e polimixinas (MAGIORAKOS et al., 2012). De acordo com um estudo internacional multicêntrico, a prevalência de cepas MDR nos casos de pneumonia nosocomial variou entre 20,5% e 44,2% e de cepas XDR entre 2,8% e 34,2% (MICEK et al., 2015).

Em revisão sistemática e metanálise, Nathwani et al. (2014) identificaram taxas de mortalidade intra-hospitalar geral por infecção por cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, entendido como resistência a mais de um agente em três ou mais categorias de antibióticos, variando de 25 a 60%, de 15 a 59% por cepas resistentes e de 7 a 50% por cepas suscetíveis. Lu et al. (2014) observaram uma taxa de mortalidade geral de 19% em pacientes com pneumonia nosocomial relacionado à *P. aeruginosa*, obtendo variações da taxa entre diferentes sorotipos do antígeno O,

um polissacarídeo presente na membrana de bactérias Gram-negativas, sendo a maior, 40%, do sorotipo O1, e a menor, 0%, do sorotipo O2.

Algumas cepas demonstram habilidade de adesão e internalização nas células epiteliais (LEPANTO et al., 2014) e alguns isolados clínicos, além de conseguirem romper a barreira epitelial intestinal, apresentam alta motilidade e adesividade, o que significa que eles possuem o potencial de induzir sepse de origem intestinal (ZABORINA et al., 2006).

Pohl et al. (2014) identificaram similaridades genéticas do genoma acessório de diversas cepas da *P. aeruginosa* com o DNA de outras espécies de microrganismos, indicando a possibilidade de tais genes terem sido adquiridos por transferência horizontal de genes.

A expressão de proteínas ou fatores de virulência como elastase, protease, exotoxina A, protease alcalina, ramnolipídios, lectina, cianeto de hidrogênio e piocianina, é regulada por redes de comunicação intra e interespecies - *quorum sensing* (QS) - pqs, las, rhl e iqs – as quais são fortemente influenciadas por fatores ambientais e do hospedeiro, e de condições de disponibilidade de nutrientes (LEE; ZHANG, 2014; WELSH; BLACKWELL, 2016).

1.3.3 INTERAÇÕES ENTRE *S. maltophilia* E *P. aeruginosa*

Questões recentes sobre a complexidade de infecções levaram Short; Murdoch; Ryan (2014) a revisar a ideia de os microrganismos atuarem conjuntamente para facilitar a progressão de uma doença caracterizando a infecção polimicrobiana, na qual podem ocorrer relações sinérgicas, competitivas ou neutras entre os microrganismos. As consequências de uma coinfeção e as interações entre as bactérias dominantes identificadas em infecção de fibrose cística pulmonar - *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* e complexo *Burkholderia cepacia* - podem ser uma maior tolerância a antibióticos, desenvolvimento de biofilme e de biomassa, percepção de metabólitos e sinalizações mediadas pelas moléculas de comunicação célula-célula DSF e AI-2 (furanosil borato diéster – C₅H₁₀BO₇). A sinalização mediada de AI-2 por outros microrganismos poderia modular a virulência de *P. aeruginosa* na fibrose cística pulmonar.

A sinalização mediada pela DSF entre a *S. maltophilia* e a *P. aeruginosa* afeta a estrutura do biofilme da *P. aeruginosa* e pode promover a persistência e a disseminação, aumentar a tolerância a polimixinas e peptídeos catiônicos, e influenciar na síntese de fatores de virulência e de resposta a estresse (RYAN et al., 2008; SHORT; MURDOCH; RYAN, 2014; TWOMEY et al., 2012). Os sinais de acil-homoserina lactona (AHL) produzidos por *P. aeruginosa* podem provocar uma motilidade aumentada da *S. maltophilia* (MARTÍNEZ et al., 2015).

Schwering et al. (2013) observaram um expressivo aumento da resistência ao cloro em *P. aeruginosa* e em *S. maltophilia* quando estas foram cultivadas na forma de biofilme ao invés de sua forma planctônica, e um aumento ainda mais expressivo de suas resistências quando presentes em um biofilme multiespécie, sugerindo que uma comunidade bacteriana mista promove barreiras adicionais ao biofilme de uma única espécie. Além disso, os biofilmes promovem a estabilidade de plasmídeos, podendo aumentar a capacidade de transferência de elementos genéticos móveis e a taxa de ocorrência de transferência horizontal de genes (MADSEN et al., 2012; ROSSI et al., 2014).

A hipótese da ocorrência de transferência horizontal de genes entre bactérias em alimentos e no trato gastrointestinal também tem sido levantada recentemente. Conforme revisão de Rossi et al. (2014), a transferência horizontal de genes pode ocorrer por conjugação, transdução e transformação, porém ainda não há estudos suficientes tanto para comprovar como para afastar a possibilidade da ocorrência da transferência horizontal de genes entre bactérias na matriz alimentar, sendo poucas as informações e evidências de como ou se a composição do alimento e sua microbiota afetam a frequência ou o tipo de transferência.

1.3.4 *S. maltophilia* E *P. aeruginosa* NA ÁREA CLÍNICA

Nos ambientes clínicos e farmacêuticos, a *P. aeruginosa* já foi identificada em bases galênicas (BONFILIO et al., 2013), mangueiras de dispositivo de sucção utilizado em ambientes dentários (O'DONNELL et al., 2005), dispensador de sabonete asséptico (LANINI et al., 2011), endoscópios (KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2010), torneiras (ABREU et al., 2014; CUTTELOD et al., 2011; WANG et al., 2009), prontuários médicos (CHEN; CHEN; WANG, 2014), mesa de

cabeceira, chuveiro, sabonete, bandeja, bancada (ABREU et al., 2014), pia (ABREU et al., 2014; BROOKE, 2008), água para hemodiálise (ARVANITIDOU et al., 2003; LIMA et al., 2005; MONTANARI et al., 2009), água de abastecimento público (ARVANITIDOU et al., 2003; CERVIA et al., 2010; LOVEDAY et al., 2014; MONTANARI et al., 2009; VENIER et al., 2015) e água potável proveniente de dispensadores de água microfiltrada (SACCHETTI et al., 2014).

Nos ambientes clínicos, a *S. maltophilia* já foi identificada em cateter venoso central (BROOKE, 2012; LAI et al., 2006; METAN et al., 2006), mangueiras de dispositivo de sucção utilizado em ambientes dentários (BROOKE, 2012; O'DONNELL et al., 2005), resíduos odontológicos (BROOKE, 2012; VIEIRA et al., 2011), sensores de temperatura do ventilador eletrônico, circuitos do ventilador de inspiração/expiração (BROOKE, 2012; ROGUES et al., 2001), endoscópios (BROOKE, 2012; KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2010), torneira (ABREU et al., 2014; BROOKE, 2012; DENTON et al., 1998; WANG et al., 2009; WEBER et al., 1999), nebulizadores (BROOKE, 2012; DENTON et al., 2003), pia (ABREU et al., 2014; BROOKE, 2008, 2012; DENTON et al., 1998, 2003), grade da cama, mesa de cabeceira, reanimador pulmonar manual, válvulas de oxigênio, ar e vácuo, bomba intravenosa, superfície de cartela de medicamento, estetoscópio, monitor do ventilador mecânico, mesa sobrecama (GALLO et al., 2016), escova de dente, flores (DENTON et al., 1998), água de alta pureza (MINOGUE et al., 2015), água para hemodiálise (ARVANITIDOU et al., 2003; BROOKE, 2012; LIMA et al., 2005) e água de abastecimento público (ARVANITIDOU et al., 2003; BROOKE, 2012; CERVIA et al., 2010; DENTON et al., 2003; MONTANARI et al., 2009; SAKHNINI; WEISSMANN; OREN, 2002; SIMÕES et al., 2007; VERWEIJ et al., 1998).

Denton et al. (1998) observaram uma maior taxa de isolamento de *S. maltophilia* no ambiente das casas de pacientes (39%) do que do hospital (28%) e não encontraram diferença de prevalência do microrganismo entre as casas de pacientes colonizados e de não colonizados, concluindo que a prevalência de *S. maltophilia* adquirida fora de ambientes hospitalares pode ser maior do que o esperado.

1.3.5 *S. maltophilia* E *P. aeruginosa* NA ÁREA DE ALIMENTOS

Somente com o conhecimento de todo o ciclo de vida dos patógenos, incluindo a sua vida não-clínica, é que se conseguirá um efetivo controle sobre esses microrganismos (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005; BERG et al., 2014; FAUCHER; CHARETTE, 2015).

A alimentação é a principal forma para a entrada de bactérias no trato gastrointestinal humano e as bactérias com genes de resistência a antibióticos ingeridas poderiam transferir tais genes às bactérias patogênicas ou oportunistas do trato gastrointestinal (ROSSI et al., 2014). O isolamento de *P. aeruginosa* em alimentos é uma ligação direta com a história do desenvolvimento da dieta neutropênica (KOMINOS et al., 1972; SOMERVILLE, 1986; WRIGHT; KOMINOS; YEE, 1976).

A resistência antimicrobiana transmitida pelos alimentos, principalmente a resistência a β -lactâmicos e carbapenêmicos, é uma questão complexa e urgente para as autoridades de segurança de alimentos, sendo considerada um perigo biológico, uma vez que os alimentos podem atuar como reservatórios de genes de resistência (EFSA BIOHAZ PANEL, 2008, 2011, 2013). Os microrganismos psicrótróficos, onde estão incluídas a *S. maltophilia* e a *P. aeruginosa*, conseguem se desenvolver à temperatura de 7°C ou menos, independentemente da temperatura ótima de crescimento, e podem agir como reservatórios de resistência antimicrobiana na cadeia do leite (MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2007).

As mastites bovinas clínica e subclínica podem ser causadas por diversos microrganismos, inclusive pela *P. aeruginosa* e pela *S. maltophilia* (BHANDERI et al., 2014; FERNANDES et al., 2009; OHNISHI et al., 2012). Ohnishi et al. (2012) reportaram um caso raro de mastite bovina causada por *S. maltophilia* com grau variado de resistência a antimicrobianos. Na análise de um surto de mastite bovina no interior do Estado de São Paulo, cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* foram isoladas do gado com mastite hiperaguda e subclínica, da solução do pré-dipping, que é um antisséptico utilizado para imersão dos tetos das vacas na etapa pré-ordenha, e da água utilizada na lavagem dos insufladores, que são equipamentos utilizados na ordenha mecânica (FERNANDES et al., 2009).

A análise da mastite bovina, inclusive a subclínica, é crucial, uma vez que linhagens de microrganismos multirresistentes podem estar presentes e o leite pode ser indevidamente enviado para a produção ou para o mercado (FERNANDES et al., 2009). É necessário cautela na análise da mastite subclínica, uma vez que Bhanderi et al. (2014) relatam que o método tradicional de cultivo não foi capaz de detectar a *P. aeruginosa* e a *S. maltophilia* identificadas pelo método de pirosequenciamento em amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

Mallet (2007) identificou, através de métodos bioquímicos, *P. aeruginosa* nas águas utilizadas nas propriedades leiteiras em Minas Gerais nas cidades Aguanil, Boa Esperança, Candeias, Campo Belo, Coqueiral e Nepomuceno. Foi verificado que nenhum dos 25 estabelecimentos utilizavam água tratada e ainda foi observada variação de incidência de *P. aeruginosa* entre os períodos de outono (12%), inverno (3,12%) e primavera (0%).

A utilização de análises independentes de cultivo e de sequenciamentos de nova geração aumentou consideravelmente o conhecimento sobre a microbiota dos leites cru e pasteurizado. O leite cru possui uma microbiota altamente diversificada, composta principalmente por bactérias lácticas como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* spp.; no entanto, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia* spp. e outras bactérias também podem estar presentes em quantidades significativas (QUIGLEY et al., 2013a).

Munsch-Alatossava; Alatossava (2006, 2007) isolaram microrganismos de 13 amostras de leite cru na Finlândia e realizaram identificação através de métodos bioquímicos com o kit API 20NE e o sistema BIOLOG GN2, encontrando divergências de identificação entre os métodos, o que levantou dúvidas na identificação de alguns microrganismos, inclusive de *S. maltophilia*. Os isolados de *S. maltophilia* apresentaram resistência a β -lactâmicos (ticarcilina, ticarcilina-ácido clavulônico, piperacilina, piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, fosfomicina), a aminoglicosídeos (tobramicina, amicacina, gentamicina, netilmicina), e a quinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina); e os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram resistência somente ao cotrimoxazol, inibidor da biossíntese e metabolismo do folato.

De um total de 24 amostras de leite cru coletadas de 12 fazendas da região de Basse-Normandie na França, Mallet et al. (2012) isolaram 53 diferentes gêneros

e 112 espécies de bactérias e 8 gêneros e 17 espécies de leveduras. As bactérias Gram-negativas corresponderam a 33,9% das bactérias isoladas. A *S. maltophilia* foi a bactéria Gram-negativa com maior detecção, identificada em 50% das amostras, o que a posicionou entre as dez mais frequentes espécies detectadas, e a *P. aeruginosa* foi identificada em 21% das amostras.

Lactococcus, *Microbacterium*, *Chryseobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* foram os gêneros predominantes dentre 240 microrganismos isolados de leite cru no Japão, com 12,1% dos isolados identificados como *S. maltophilia* e 2,1% como *P. aeruginosa* (HAGI et al., 2013).

A pasteurização reduz a carga microbiana presente no leite, no entanto, os grupos taxonômicos presentes no leite pasteurizado e cru são similares (QUIGLEY et al., 2013b). A eficiência da pasteurização rápida (HTST), avaliada por método de cultivo, sobre uma população de *Pseudomonas* apresentou uma redução populacional logarítmica de 6. No entanto, ao se avaliar a eficiência da pasteurização através de citometria de fluxo e da quantificação pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), a redução logarítmica verificada foi menor que 2, o que significa que as células sobreviventes ao processo de pasteurização podem estar em estado viável, mas não cultivável – VBNC. As células não são cultiváveis, uma vez que não foi observado o desenvolvimento da população no método de cultivo, entretanto, elas possuem atividade celular, detectada pelo método de citometria de fluxo (QUIGLEY et al., 2013a, 2013b).

El-Roos et al. (2013) verificaram a prevalência de *P. aeruginosa* de 40% em leite cru e 16% em leite pasteurizado de amostras obtidas em supermercados na governadoria de Qaluobia, Egito. Os isolados apresentaram uma elevada patogenicidade e foi detectada a produção das enzimas hemolisina, fosfolipase, caseinase e gelatinase.

As indústrias de laticínios, mesmo com plantas higienizadas, podem estar contaminadas por *S. maltophilia*. Cleto et al. (2012) identificaram as principais culturas cultiváveis de microrganismos em uma linha de processamento industrial de leite em Portugal, que por 3 anos havia sido submetida diariamente a um ciclo diário de limpeza com ácido nítrico diluído, solução concentrada de hidróxido de sódio e rinsagem com água. Dentre as principais culturas foram encontradas *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus sciuri* e *S. maltophilia*. Foram identificadas

predominantemente nas placas do trocador de calor *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., e na junta entre o tanque de estocagem e a bomba de transferência *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *S. maltophilia*. Mais de 70% dos isolados apresentaram grande poder de adesão à superfície de polietileno e todos os gêneros tiveram pelo menos um isolado capaz de formar biofilmes.

Microrganismos produtores de biofilme ou que aderem fortemente à superfícies são ameaças à segurança microbiológica de indústrias de laticínios (CHERIF-ANTAR et al., 2016; CLETO et al., 2012). Cherif-Antar et al. (2016) isolaram das tubulações de aço inoxidável de uma planta de processamento de leite diversas bactérias Gram-positivas e negativas presentes nas regiões antes e depois do pasteurizador. As bactérias Gram-negativas isoladas na região depois do pasteurizador foram *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* e *Escherichia vulneris*. Destas, *K. pneumoniae*, *A. calcoaceticus* e *P. aeruginosa* apresentaram moderada a elevada capacidade de produção de biofilme.

Castro (2012) identificou em uma indústria de laticínios a presença de *P. aeruginosa* no leite cru, no equipamento de ordenha, no piso da sala de pasteurização, no piso e no ralo da sala de queijos. A *P. aeruginosa* apresentou capacidade de formação de biofilme em chapas de aço inoxidável AISI 304 em temperaturas variando de 7 °C a 47 °C. Além disso, foi verificado que os sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina, utilizados nas concentrações recomendadas, reduziram a população de microrganismos presentes no biofilme formado por *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, de forma isolada ou co-cultivadas, no entanto, em nenhum dos casos houve eliminação dos microrganismos.

Coton et al. (2012) observaram a diversidade microbiana presente em queijos e leites da França através da reação em cadeia da polimerase, identificando a presença de *P. aeruginosa* e de *S. maltophilia* em leites. Em contraste ao observado por Munsch-Alatossava; Alatossava (2007), seus resultados mostraram que uma cepa de *P. aeruginosa* e duas cepas de *S. maltophilia* apresentaram resistência a sete agentes da família dos β -lactâmicos, ao imipenem, ao monobactâmico aztreonam, a cefemas, à colistina, ao cloranfenicol, à tetraciclina, à rifampicina e à sulfamida; e sensibilidade intermediária a aminoglicosídeos, a quinolonas, e um da

família dos β -lactâmicos. Uma cepa de *S. maltophilia* apresentou resistência a quatro agentes da família dos β -lactâmicos, ao monobactâmico aztreonam, a dois da família das cefemas, à fosfomicina, ao clorofenicol e à tetraciclina; e sensibilidade intermediária a dois da família dos aminoglicosídeos, a quatro da família de β -lactâmicos, a um da família das cefemas, a quinolonas, à colistina, à rifampicina e à sulfamida.

É importante citar o isolamento de cepas de *P. aeruginosa* no oceano aberto. Um isolado de *P. aeruginosa* obtido do mar pôde tolerar altas concentrações de NaCl e pH elevado, enquanto um isolado obtido de água doce teve melhor crescimento em solução de NaCl variando de 0 a 3% e pH menor que 7,0, e um isolado clínico teve melhor crescimento a pH neutro e 0% de NaCl, demonstrando a capacidade de adaptação do microrganismo ao meio (KHAN et al., 2010). Em uma solução 7% de NaCl, 63% das células das cepas obtidas no mar mantiveram a culturabilidade em 24 horas, bem como 9% das células de cepas obtidas em água doce e 4% das cepas isoladas de ambientes clínicos (KHAN et al., 2007).

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os locais ou produtos com identificação positiva de *S. maltophilia* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Tabela 1: Locais ou produtos com identificação positiva de *Stenotrophomonas maltophilia*

Local/Produto	Referência
Área de preparação de alimentos em hospital	(DENTON et al., 1998; SETLHARE et al., 2013)
Pano de prato, flanela, esponja de aço, esponja, bacia, escova de limpeza, máquina lava-louças, triturador de lixo, batata	(DENTON et al., 1998)
Máquina de refrigerantes	(BROOKE, 2012; WHITE et al., 2010)
Cenoura, alface	(OIE et al., 2008)
Rizosfera das plantas	(BERG; EBERL; HARTMANN, 2005; BROOKE, 2012; JAKOBI et al., 1996; MINKWITZ; BERG, 2001)
Rúcula	(BERG et al., 2014)
Saladas prontas para o consumo	(BROOKE, 2012; QURESHI et al., 2005)
Água envasada	(BROOKE, 2012; WILKINSON; KERR, 1998)
Água de abastecimento público	(BROOKE, 2012; DENTON et al., 1998; SILBAQ, 2009)
Sistema de tratamento e distribuição de água	(BROOKE, 2012; HOEFEL et al., 2005)
Atum Albacora	(BEN-GIGIREY et al., 2000)
Tucunaré e Piramutaba	(DAMASCENO et al., 2015)
Leite de vaca	(COTON et al., 2012; HAGI et al., 2013; MALLET et al., 2012; MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006)
Leite de cabra	(CALLON et al., 2007)
Queijo de leite cru <i>Saint-Nectaire</i>	(DELBÈS; ALI-MANDJEE; MONTEL, 2007)
Queijo <i>Pecorino Siciliano</i>	(TODARO et al., 2011)
Queijo Minas frescal	(CARVALHO, 2003)

Tabela 2: Locais ou produtos com identificação positiva de *Pseudomonas aeruginosa*

Local/Produto	Referência
Mãos de manipuladores	(SOUZA; SANTOS, 2009)
Repolho, cenoura, pepino, alface, batata-doce	(ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012)
Berinjela, mini-tomate, espinafre	(OIE et al., 2008)
Rúcula	(BERG et al., 2014)
Tomate	(ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012; OIE et al., 2008)
Rizosfera das plantas	(BERG; EBERL; HARTMANN, 2005)
Saladas prontas para o consumo	(ALLYDICE-FRANCIS; BROWN, 2012; FRANZETTI; SCARPELUNI, 2007)
Água envasada	(BRANDÃO et al., 2012; NUNES; MOTA; CALDAS, 2013; PEDROSA et al., 2014)
Gelo	(WHITE et al., 2010)
Água potável de dispensadores de água microfiltrada	(SACCHETTI et al., 2014)
Água de abastecimento público utilizada em cozinha de escolas	(ALMEIDA et al., 2009)
Galinha, carne moída	(KESKIN; EKMEKÇI, 2007)
Carne de porco	(WONG; CHAN; CHEN, 2015)
Alimentos prontos para consumo, condimentos e especiarias	(NUNES; MOTA; CALDAS, 2013)
Leite e derivados de leite	(NUNES; MOTA; CALDAS, 2013)
Leite de vaca	(CARVALHO et al., 2009; COTON et al., 2012; HAGI et al., 2013; KESKIN; EKMEKÇI, 2007; MALLET et al., 2012; MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006; NUNES; MOTA; CALDAS, 2013)
Queijos Minas Frescal artesanal e industrializado	(CARVALHO et al., 2009)
Queijo branco artesanal	(ARSLAN; EYI; ÖZDEMİR, 2011)
Queijo fresco	(AL-SHAMMARY, 2015)
Queijo <i>Domiat</i>	(HAMMAD, 2015)

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Pesquisa de *Stenotrophomonas maltophilia* e de *Pseudomonas aeruginosa* em queijos Minas frescal comercializados no município do Rio de Janeiro.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Verificar as condições de temperatura de comercialização dos queijos nos locais de compra;
- b) Detectar os microrganismos-alvo através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram visitados 24 estabelecimentos comerciais formais no município do Rio de Janeiro de 14 diferentes redes distribuidoras, resultando em 39 medições de temperatura para fins de coleta e 33 amostras coletadas de queijo Minas frescal.

No período de maio a outubro de 2015 foram coletadas 17 amostras de queijo Minas frescal provenientes de 17 diferentes marcas de 15 empresas produtoras. No período de outubro de 2015 a janeiro de 2016 foram coletadas outras 16 amostras das mesmas marcas da primeira coleta, porém de lotes diferentes.

As amostras foram codificadas com uma letra que indica a marca seguida por um número que indica a coleta: A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1, I1, J1, K1, L1, M1, N1, O1, P1, Q1, A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2, I2, J2, K2, L2, M2, O2, P2 e Q2. Uma empresa produtora é responsável por 3 marcas (C, D e J), portanto, as amostras C1, C2, D1, D2, J1 e J2 são provenientes da mesma empresa. Não foi possível coletar a amostra de um novo lote referente ao código N2 uma vez que a linha do produto foi descontinuada pelo fabricante.

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão de produtos e estabelecimentos, respeitando-se os requisitos da RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001):

- a) Embalagem: Original e não violada;
- b) Temperatura na superfície: Menor ou igual a 8 °C;
- c) Carimbo de Inspeção: Presença de carimbo de inspeção do Serviço de Inspeção Federal (SIF), Estadual (SIE) ou Municipal (SIM);
- d) Data de Validade: Produtos dentro do período de validade;
- e) Produto visualmente não alterado e não deteriorado;
- f) Estabelecimento comercial devidamente formalizado.

A temperatura de armazenamento no balcão refrigerado foi verificada com termômetro de infravermelho Skill-Tec SKTI-550, precisão $\pm 1,5\%$, no momento de aquisição. As amostras foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo durante a condução ao laboratório e armazenadas em geladeira a 8 °C até o momento de análise, no máximo 24 horas após a coleta, garantindo a manutenção da temperatura de refrigeração.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo das amostras foi feito conforme procedimentos indicados para produtos pastosos pela Instrução Normativa MAPA nº 62/2003 (BRASIL, 2003), com modificações. Realizou-se a assepsia da embalagem com etanol 70% e se promoveu a desintegração do queijo diretamente na embalagem original com a finalidade de incorporar a fase líquida, soro, à fase sólida, queijo, tornando a amostra pastosa e homogênea. Dentro da cabine de biossegurança, com o auxílio de tesoura previamente esterilizada, foi feito o corte da embalagem e pesagem, assepticamente, em balança analítica BG 200 (Gehaka, Brasil) de $25,0 \pm 0,2$ g de amostra, colhida de vários pontos com auxílio de colher estéril, procedendo à sua homogeneização em erlenmeyer estéril com 225 mL de caldo GN (HiMedia, Índia), meio seletivo para bactérias Gram-negativas.

3.3 CULTURA EM PLACAS

O erlenmeyer com o caldo GN foi incubado a 35 °C por 24 horas na incubadora B.O.D. SL 200/334 (Solab, Brasil) para a recuperação e pré-enriquecimento de células bacterianas Gram-negativas estressadas.

Coletou-se uma alíquota de 1,0 mL do caldo GN para a extração do DNA total e foram semeadas qualitativamente, por esgotamento de 10 µL do caldo GN com alça de platina, cinco placas com ágar MacConkey (HiMedia, Índia), meio seletivo para bactérias Gram-negativas, e cinco placas com ágar Cetrimide (HiMedia, Índia), meio seletivo e diferencial para *P. aeruginosa*. Procedeu-se à incubação a 35 °C por 24 horas das 10 placas.

3.4 COLETA DAS COLÔNIAS

3.4.1 *S. maltophilia*

Todas as colônias que se desenvolveram nas placas com ágar MacConkey foram coletadas em microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 0,8 mL de caldo soja tripticaseína (TSB) e 0,2 mL de glicerol.

3.4.2 *P. aeruginosa*

Foram coletadas duas colônias de cada placa com ágar Cetrimide, observando, principalmente, mas não exclusivamente, a existência de colônias típicas do microrganismo: colônias grandes, com bordas irregulares, com produção de fluoresceína e/ou de pigmentos hidrossolúveis como piocianina, pioverdina, piorrubina ou piomelanina. Foram coletadas colônias excedentes quando mais de duas colônias distintas apresentaram fluorescência em UV a 302 nm ou produção de pigmentos.

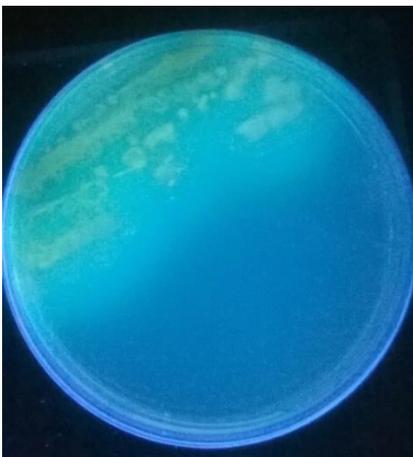
As colônias típicas de *P. aeruginosa* no ágar cetrimide estão apresentadas na figura 3 e a visualização da fluorescência das colônias em UV a 302 nm está apresentada na figura 4.

Cada colônia foi ressuspensa em tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo GN e incubada a 35 °C por 24 horas para enriquecimento. Procedeu-se à coleta de 1,0 mL do caldo GN para extração de DNA e 0,8 mL do caldo GN, com adição de 0,2 mL de glicerol, para estoque.

Figura 3: Colônias típicas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio ágar Cetrimide



Figura 4: Observação das colônias de *P. aeruginosa* ATCC 27853 em ultravioleta



3.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração e a purificação de DNA foram realizadas com o kit comercial de extração GeneJET Genomic DNA Purification KIT (ThermoScientific, Lituânia) de acordo com as instruções do fabricante para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas, conforme descrito abaixo.

A alíquota de 1,0 mL de caldo GN, contendo os microrganismos, foi centrifugada a 5000 x g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Para realizar a pré-lise das células, o *pellet* foi ressuscitado em 180 µL de Solução de Digestão e foram adicionados 20 µL de solução de Proteinase K, procedendo à homogeneização através de pipetagens sucessivas até se obter uma solução homogênea. A solução foi incubada a 56°C por 30 minutos, com homogeneização manual a cada 10 minutos.

Para eliminar o RNA contaminante, foram adicionados 20 µL de solução de RNase A, homogeneizando com o agitador de tubos e incubando a mistura por 10 minutos à temperatura ambiente. Para a lise das células, foram adicionados 200 µL de Solução de Lise, homogeneizando a mistura por 15 segundos no agitador de tubos. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 200 µL de etanol 99,5% à solução, com homogeneização no agitador de tubos.

Para purificação do DNA, a alíquota de 620 µL de amostra lisada foi transferida para uma Coluna de Purificação de DNA Genômico GeneJET previamente inserida em um tubo coletor. A coluna foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto e a solução contida no tubo coletor foi descartada. Adicionaram-se 500 µL do Tampão de Lavagem I à coluna, centrifugando por 1 minuto a 8000 x g e descartando a solução do tubo coletor. Em seguida, adicionaram-se 500 µL do Tampão de Lavagem II à coluna, centrifugando por 3 minutos a 12000 x g. O tubo coletor foi descartado e a coluna foi inserida em um microtubo tipo *Eppendorf*.

Para eluir o DNA purificado da coluna, foram adicionados 200 µL de Tampão de Eluição à coluna, deixando em incubação por 2 minutos à temperatura ambiente e centrifugando a 8000 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o DNA, no microtubo tipo *Eppendorf*, foi congelado para utilização posterior na reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Foram utilizados os pares de *primers* e respectivos protocolos de Gallo et al. (2013) e de WHITBY et al. (2000) para identificação de *S. maltophilia*, de Choi et al. (2013) para identificação de *P. aeruginosa*, e de Spilker et al. (2004) para identificação do gênero *Pseudomonas spp.*, conforme Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: Protocolos de PCR - primers

Microrganismo	Autores	Gene	Tamanho (pb)	Sequência
<i>S. maltophilia</i>	Gallo et al. (2013)	23S rRNA	278	Direto (<i>Forward</i>) 5'GCTGGATTGGTTCTAGGAAAACGC3' Reverso (<i>Reverse</i>) 5'ACGCAGTCACTCCTTGCG3'
	Whitby et al. (2000)	23S rRNA	531	Direto (<i>Forward</i>) 5'CAGCCTGCGAAAAGTA3' Reverso (<i>Reverse</i>) 5'TTAAGCTTGCCACGAACAG3'
<i>P. aeruginosa</i>	Choi et al. (2013)	O-antígeno acetilase	232	Direto (<i>Forward</i>) 5'CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC3' Reverso (<i>Reverse</i>) 5'GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC3'
<i>Pseudomonas spp.</i>	Spilker et al. (2004)	16S rDNA	618	Direto (<i>Forward</i>) 5'GACGGGTGAGTAATGCCTA3' Reverso (<i>Reverse</i>) 5'CACTGGTGTTTCCTTCTATA3'

Tabela 4: Protocolos de PCR - tempos e temperaturas

	<i>S. maltophilia</i>		<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Gallo et al. (2013)	Whitby et al. (2000)	Choi et al. (2013)	Spilker et al. (2004)
Desnaturação Inicial	94 °C / 5 min	95 °C / 5 min	95 °C / 3 min	95 °C / 2 min
Ciclos	30	30	35	25
Desnaturação	94 °C / 45 s	95 °C / 10 s	95 °C / 60 s	94 °C / 20 s
Anelamento	68 °C / 45 s	58 °C / 10 s	63 °C / 30 s	54 °C / 20 s
Extensão	72 °C / 45 s	72 °C / 60 s	72 °C / 60 s	72 °C / 40 s
Extensão Final	72 °C / 10 min	72 °C / 2 min	72 °C / 10 min	72 °C / 1 min

Tabela 5: Protocolos de PCR – concentrações/volumes de reagentes

	<i>S. maltophilia</i>		<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	Gallo et al. (2013)	Whitby et al. (2000)	Choi et al. (2013)	Spilker et al. (2004)
Volume reacional	25,0 µL	50,0 µL	25,0 µL	25,0 µL
DNA	2,0 µL	4,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
dNTP	200 µM de cada	200 µM de cada	200 µM de cada	250 µM de cada
Tampão PCR 10X	2,5 µL	5,0 µL	2,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	2,0 mM
Taq DNA polim.	1,0 U	1,25 U	2,0 U	1,0 U
Primers (de cada)	2,0 µM	1,0 µM	0,8 µM	0,4 µM

As cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, *S. maltophilia* INCQS 00103 (ATCC 13637) (PALLERONI; BRADBURY, 1993) e *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 27853) (ANUJ et al., 2009), foram utilizadas como controles positivos e água estéril como controle negativo da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Foram utilizados o kit da Invitrogen (EUA) contendo tampão de PCR 10X, $MgCl_2$ e *Taq* DNA polimerase recombinante, o conjunto de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) da Ludwig Biotec (Brasil) e os *primers* sintetizados pela Integrated DNA Technologies (EUA). As ampliações de DNA foram realizadas no termociclador LifeTouch Thermal Cycler (BIOER, China).

3.7 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

Os produtos foram corados com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, Brasil) e aplicados, paralelamente a marcadores de peso molecular (100 pb DNA Ladder RTU – Kasvi, Brasil; Mid Range DNA Ladder – Jena Bioscience, Alemanha; 100 pb DNA Ladder – Invitrogen, EUA), em gel de agarose 0,8% (Hexapur Bio Lab, Holanda) em cuba de eletroforese horizontal na voltagem de 85 V contendo Tris-Borato-EDTA (Promega, EUA) como tampão de corrida. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador de UV (Forlab, Brasil) a 302 nm.

3.8 VERIFICAÇÃO *IN SILICO* DA ESPECIFICIDADE DOS PARES DE *PRIMERS*

A verificação *in silico* da especificidade dos pares de primers foi realizada através do programa Primer-BLAST (YE et al., 2012) com os seguintes parâmetros diferindo do padrão: *Database* = nr (nucleotídeos); *Organism*: Em branco.

Os *primers* foram classificados como de alta especificidade nos casos em que a porcentagem das entradas de microrganismos não-alvos foi inferior a 5%, consideradas somente as entradas pertencentes ao reino *Bacteria* e excluídas as entradas de microrganismos não identificados.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

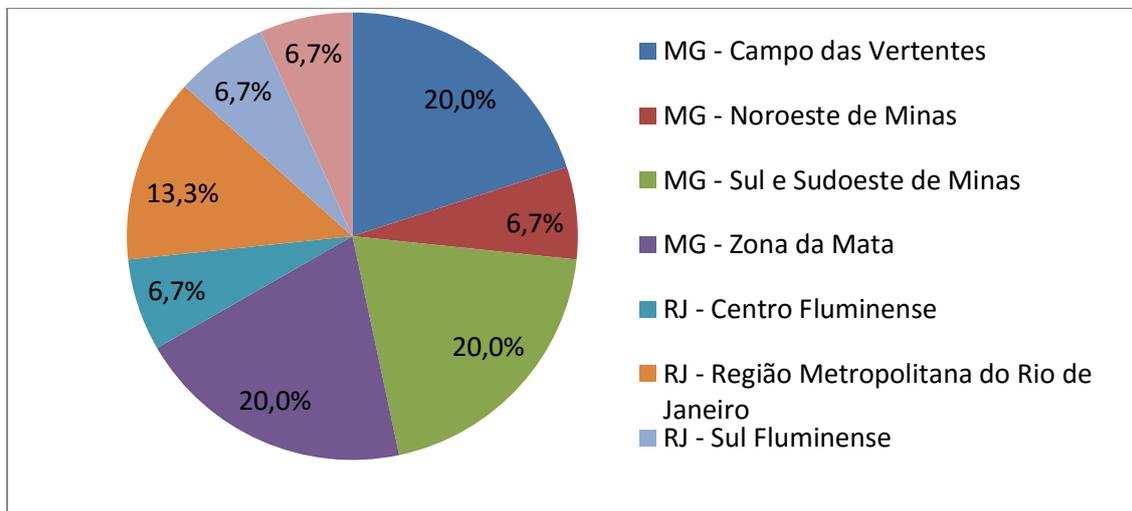
A análise estatística dos dados de temperatura de comercialização e validade foi realizada com o auxílio do programa estatístico Minitab® versão 14.12.0.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS GERAIS E LEVANTAMENTO DE TEMPERATURA DE COMERCIALIZAÇÃO

De 15 empresas produtoras dos queijos adquiridos, 10 são do Estado de Minas Gerais, 04 são do Estado do Rio de Janeiro e 01 é do Estado do Espírito Santo. A distribuição geográfica das empresas produtoras por mesorregiões está apresentada no gráfico 1.

Gráfico 1: Distribuição geográfica das empresas produtoras - Mesorregiões



Os dados de prazo de validade e prazo de validade após abertura apresentaram uma distribuição não-normal, e, portanto, as medidas de dispersão foram apresentadas como mediana, amplitude interquartil, e valores mínimos e máximos, conforme Tabela 6.

Tabela 6: Análise estatística - Prazos de validade (marca) e tempo entre a análise e a fabricação (amostras)

	Prazo de validade (dias)	Prazo de validade após abertura (dias)	Tempo entre a análise e a fabricação (dias)
n	17	17	33
p-valor para o teste de normalidade de Anderson-Darling	< 0,005	< 0,005	0,016
Mediana	31,0	5	9
Amplitude interquartil	23,5 – 31,0	5 – 7	6 – 16
Mínimo / Máximo	15 / 82	3 / 7	3 / 27
Valores atípicos	82	-	-
($x < Q1 - 1,5 \times AIQ$ ou $x > Q3 + 1,5 \times AIQ$)			

Quadro 1: Medições das temperaturas de comercialização

Bairro	Rede Distr.	Data	Código	Temperatura (°C)	Faixa de temperatura indicada pelo fabricante (°C)
Barra da Tijuca	R02	11/01/16	O2	5,4	1 – 8
		21/09/15	P1	6,8	1 – 8
		21/09/15	O1	7,0	1 – 8
Botafogo	R05	09/06/15	C1	4,5	1 – 8
		09/06/15	D1	6,0	1 – 8
	R07	23/11/15	L2	6,5	2 – 8
	R09	14/09/15	N1	7,1	2 – 8
		18/10/15	-	14,8	-
		18/10/15	-	16,2	-
	R14	19/05/15	A1	6,0	1 – 8
19/05/15		B1	7,7	5 – 8	
Catete	R03	07/07/15	H1	4,2	1 – 8
		07/07/15	G1	5,4	Até 5
Copacabana	R05	20/07/15	I1	7,0	Abaixo de 8
		03/11/15	I2	7,2	Abaixo de 8
		03/11/15	C2	7,6	1 – 8
		18/08/15	J1	7,7	1 – 8
		20/07/15	-	9,0	-
	R06	01/12/15	-	9,3	-
	R08	20/07/15	-	19,0	-
	R10	18/08/15	-	10,1	-
	R11	18/10/15	G2	4,2	Até 5
		18/10/15	Q1	5,7	Até 8
R14	13/10/15	B2	4,7	5 – 8	
Flamengo	R05	09/11/15	D2	7,4	1 – 8
		16/11/15	J2	7,5	1 – 8
	R11	16/11/15	Q2	2,5	Até 8
Humaitá	R04	16/06/15	F1	6,4	Até 8
		16/06/15	E1	6,7	0 – 8
		01/12/15	F2	7,3	Até 8
		01/12/15	E2	7,6	0 – 8
Ipanema	R14	23/11/15	A2	7,0	1 – 8
Jardim Carioca	R01	11/01/16	M2	7,4	Até 8
Tijuca	R01	31/08/15	M1	4,4	Até 8
		04/01/16	H2	7,1	1 – 8
	R07	24/08/15	L1	7,2	2 – 8
	R12	12/01/16	K2	4,9	Até 8
	R13	24/08/15	K1	7,9	Até 8
Vila Isabel	R02	04/01/16	P2	7,6	1 – 8

O quadro 1 apresenta as informações das medições de temperaturas de comercialização dos produtos aferidas nos estabelecimentos comerciais.

Foram observadas temperaturas acima do limite de 8 °C em seis medições e, portanto, não foram realizadas as coletas dessas amostras: Botafogo – R09 (14,8 °C; 16,2 °C); Copacabana – R05 (9,0 °C), R06 (9,3 °C), R08 (19,0 °C), R10 (10,1 °C). As distribuições das temperaturas de comercialização não aderem ao modelo de distribuição normal, conforme observado nos Apêndices C e D e apresentado na Tabela 7, tendo, portanto, as medidas de dispersão apresentadas como mediana, amplitude interquartil, e valores mínimos e máximos.

Tabela 7: Análise estatística - Temperaturas de comercialização

	Medições de Temperatura	Amostras coletadas
n	39	33
Amostras com T > 8°C	6 (15,4%)	0 (0%)
p-valor para o teste de normalidade de Anderson-Darling	< 0,005	< 0,005
Mediana	7,1	7,0
Amplitude interquartil	5,7 – 7,6	5,4 – 7,4
Mínimo / Máximo	2,5 / 19,0	2,5 / 7,9
Valores atípicos ($x < Q1 - 1,5xAIQ$ ou $x > Q3 + 1,5xAIQ$)	2,5; 14,8; 16,2; 19,0	-

4.2 *S. maltophilia*

A análise de especificidade *in silico* dos *primers* de Gallo et al. (2013) e Whitby et al. (2000) estão apresentados na Tabela 8 e Apêndices E e F.

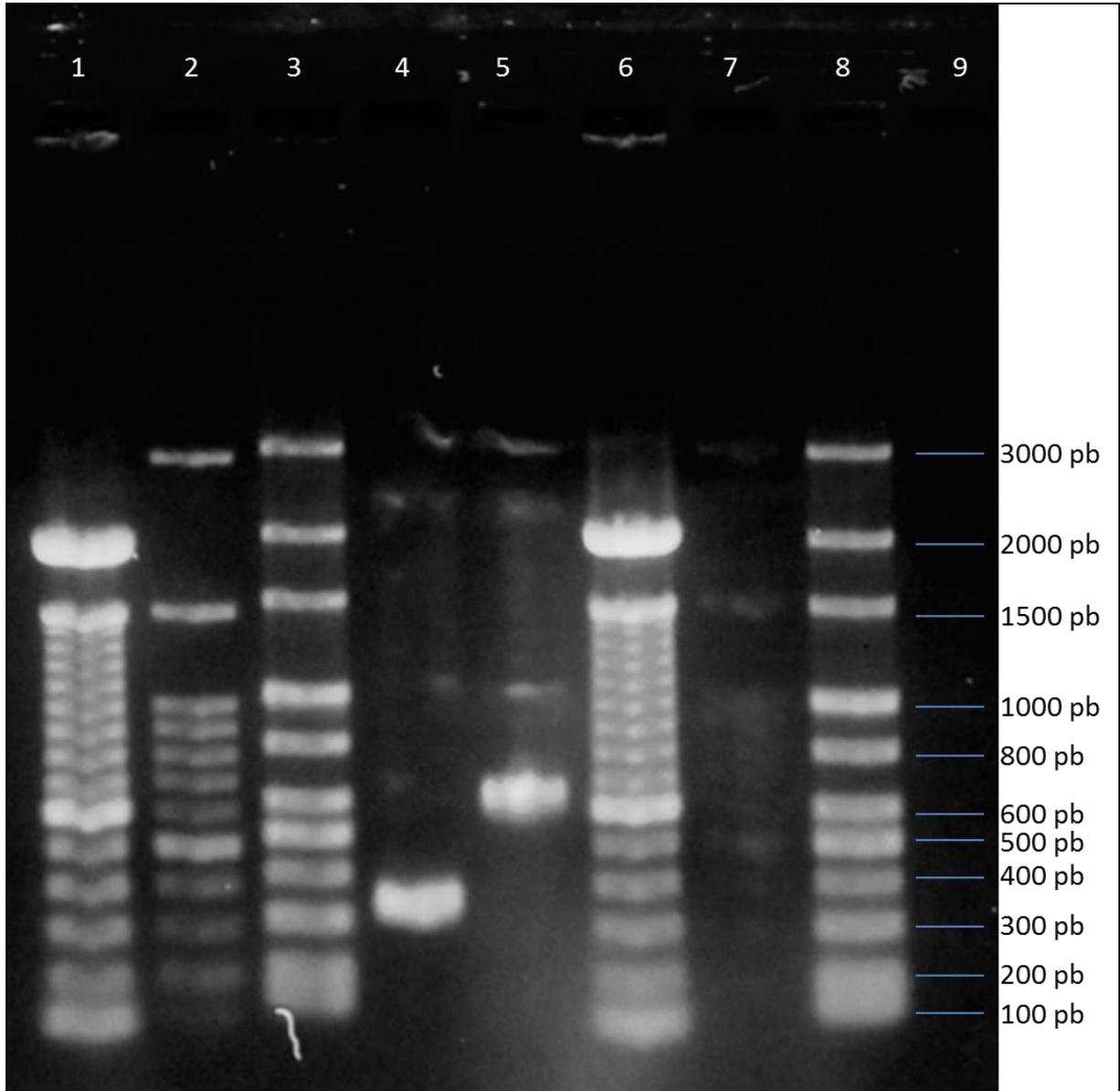
Tabela 8: Análise de especificidade de primers *in silico* - *S. maltophilia* – 31/03/2016

	Gallo et al. (2013)	Whitby et al. (2000)
Reino <i>Bacteria</i>	11/13 (85%)	33/36 (92%)
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	11/11 (100%)	17/33 (51%)
Tamanhos de produtos de não <i>Stenotrophomonas spp.</i> (pb)	-	527; 530; 531; 532
<i>S. maltophilia</i>	11/11 (100%)	13/17 (76%)
Tamanhos de produtos de não <i>S. maltophilia</i> (pb)	-	530
Tamanhos de produtos de <i>S. maltophilia</i> (pb)	278; 282	529; 532; 533; 536
Quantidade de cópias do gene	1 a 4	1 a 4

Durante o teste de especificidade dos pares de *primers* com a utilização da cepa ATCC 13637 como controle positivo, observou-se a formação de bandas com tamanhos superiores aos esperados: entre 350 pb e 400 pb para o protocolo de

Gallo et al. (2013) e entre 600 pb e 700 pb para o protocolo de Whitby et al. (2000), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5: Gel de eletroforese dos produtos da PCR de *S. maltophilia*



Gel de agarose 0,8%, 85V, 2h. Poços 1 e 6 – 100 pb DNA Ladder Invitrogen, Poços 2 e 7 – 100 pb DNA Ladder RTU Kasvi, Poços 3 e 8 – Mid Range DNA Ladder – Jena Bioscience, Poço 4 – Controle positivo *S. maltophilia* ATCC 13637 do protocolo de Gallo et al. (2013) com tamanho esperado de 278 pb, Poço 5 – Controle positivo *S. maltophilia* ATCC 13637 do protocolo de Whitby et al. (2000) com tamanho esperado de 531 pb.

4.3 *P. aeruginosa*

A análise de especificidade *in silico* dos *primers* de Choi et al. (2013) é apresentada na Tabela 9 e no Apêndice G e a de Spilker et al. (2004) na Tabela 10.

Tabela 9: Análise de especificidade de primers *in silico* - *P. aeruginosa* – 31/03/2016

	Choi et al. (2013)
Reino <i>Bacteria</i>	69/69 (100%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	69/69 (100%)
Tamanhos de produtos de não <i>Pseudomonas spp.</i> (pb)	-
<i>P. aeruginosa</i>	69/69 (100%)
Tamanhos de produtos de não <i>P. aeruginosa</i> (pb)	-
Tamanhos de produtos de <i>P. aeruginosa</i> (pb)	232
Quantidade de cópias do gene	1

Tabela 10: Análise de especificidade de primers *in silico* – *Pseudomonas spp.* – 14/05/2016

	Spilker et al. (2004)
Reino <i>Bacteria</i>	961/961 (100%)
Não identificados	387/961 (40,3%)
(Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	574
<i>Pseudomonas spp.</i> em (Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	552/574 (96,2%)
<i>Marinobacter spp.</i> em (Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	17/574 (3%)
<i>Azobacter spp.</i> em (Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	3/574 (0,5%)
<i>Ochrobacterum spp.</i> em (Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	1/574 (0,2%)
<i>Psychrobacter spp.</i> em (Reino <i>Bacteria</i> - Não identificados)	1/574 (0,2%)
Tamanhos de produtos de <i>Pseudomonas spp.</i> (pb)	545; 595; 601; 605; 612; 614; 615; 616; 617; 618; 619; 620; 621; 622; 623; 624; 625; 629; 630
Tamanhos de produtos de não identificados (pb)	615; 616; 617; 618
Tamanhos de produtos de não <i>Pseudomonas spp.</i> (pb)	617; 618; 628; 729

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da detecção por PCR. Denominadores maiores que 10 presentes nas colunas de colônias positivas representam os casos nos quais houve a coleta de colônias excedentes.

Tabela 11: Resultados da detecção por PCR

Código	<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>		Espécie x Gênero
	DNA total	Col. positivas	DNA total	Col. Positivas	
A1	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	-
B1	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	-
C1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
D1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
E1	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
F1	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
G1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
H1	-	5/8 (63%)	-	4/8 (50%)	4/5 (80%)
I1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
J1	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
K1	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
L1	+	0/11 (0%)	-	0/11 (0%)	-
M1	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
N1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
O1	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
P1	+	5/16 (31%)	-	0/16 (0%)	0/5 (0%)
Q1	+	5/15 (33%)	-	0/15 (0%)	0/5 (0%)
A2	+	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-
B2	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-

(continua)

Tabela 11: Resultados da detecção por PCR

(conclusão)

Código	<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>P. aeruginosa</i>		Espécie x Gênero	
	DNA total	Col. positivas	DNA total	Col. Positivas		
C2	+	6/15 (40%)	-	0/15 (0%)	0/6 (0%)	
D2	+	6/14 (43%)	-	0/14 (0%)	0/6 (0%)	
E2	+	6/13 (46%)	-	6/13 (46%)	6/6 (100%)	
F2	+	0/12 (0%)	-	0/12 (0%)	-	
G2	-	3/5 (60%)	-	0/5 (0%)	0/3 (0%)	
H2	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-	
I2	+	11/11 (100%)	+	11/11 (100%)	11/11 (100%)	
J2	+	9/15 (60%)	-	5/15 (33%)	5/9 (56%)	
K2	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-	
L2	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-	
M2	+	1/11 (9%)	-	0/11 (0%)	0/1 (0%)	
O2	-	0/13 (0%)	-	0/13 (0%)	-	
P2	-	0/10 (0%)	-	0/10 (0%)	-	
Q2	-	1/11 (9%)	-	0/11 (0%)	0/1 (0%)	
Total		16/31 (52%)	58/360 (16%)	1/31 (3%)	26/360 (7%)	26/58 (45%)

Na amostra H1 houve crescimento em somente oito tubos de ensaio com caldo GN após a coleta das colônias. Na amostra G2 não houve crescimento das colônias de forma isolada e, portanto, foi coletado o conteúdo total de cada uma das cinco placas para análise. Não foram extraídas alíquotas do caldo GN das amostras A1 e B1 para a análise do DNA total uma vez que, somente após a análise dessas duas amostras, houve interesse de se obter dados de análise de presença de DNA de *P. aeruginosa* no DNA total da amostra.

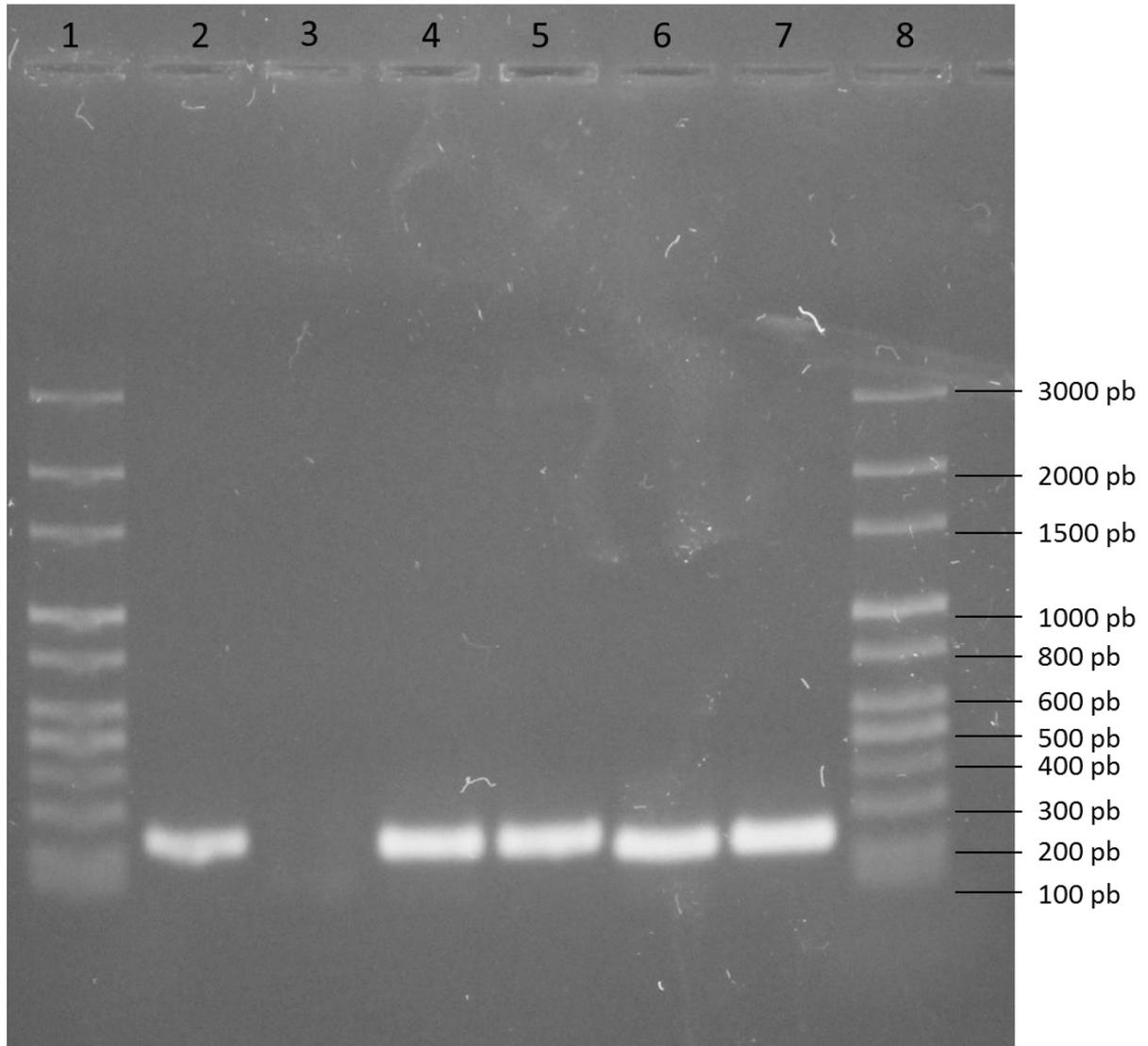
Os dados de aquisição das amostras positivas, de forma mais detalhada, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Dados de aquisição das amostras positivas para *P. aeruginosa*

	H1	E2	I2	J2
Localização do fabricante	MG - Zona da mata	MG – Sul e Sudoeste de Minas	ES – Central de Espírito-santense	MG – Campo das Vertentes
Rede distribuidora	R03	R04	R05	R05
Bairro de coleta	Catete	Humaitá	Copacabana	Flamengo
Temperatura do produto	4,2 °C	7,6 °C	7,2 °C	7,5 °C
Data de fabricação	29/06/2015	25/11/2015	26/10/2015	20/10/2015
Estação do ano	Inverno	Primavera	Primavera	Primavera
Vencimento	29/07/2015	14/12/2015	26/11/2015	19/11/2015
Data de análise	07/07/2015	01/12/2015	03/11/2015	16/11/2015
Diferença de tempo Análise e Fabricação	9 dias	7 dias	9 dias	28 dias

O gel de eletroforese dos produtos de PCR positivos para *P. aeruginosa*, no caso, amostras H1, E2, I2 e J2, está apresentado na Figura 6.

Figura 6: Gel de eletroforese dos produtos da PCR - *P. aeruginosa*



Gel de agarose 0,8%, 85V, 2h. Poços 1 e 8 – Mid Range DNA Ladder – Jena Bioscience; Poço 2 – Controle positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853 – tamanho esperado 232 pb; Poço 3 – Controle negativo; Poço 4 – Isolado H1; Poço 5 – Isolado E2; Poço 6 – Isolado I2; Poço 7 – Isolado J2

5 DISCUSSÃO

5.1 DADOS GERAIS E LEVANTAMENTO DE TEMPERATURA DE COMERCIALIZAÇÃO

Os queijos analisados eram provenientes de empresas majoritariamente do Estado de Minas Gerais, principalmente das mesorregiões Campo das Vertentes, Zona da Mata e Sul e Sudoeste de Minas.

O prazo de validade indicado no rótulo apresentou um valor mediano de 31 dias, ou seja, aproximadamente um mês, com mínimo de 15 dias e máximo de 82 dias. Os dados deste estudo foram próximos aos de Carvalho; Viotto; Kuaye (2007) que observaram, de um conjunto de 10 marcas de queijo Minas frescal produzidos com adição de cultura láctica comercializados no município de Campinas/SP, vida-de-prateleira mínima de 17 dias e máxima de 61 dias, com média de 25 dias.

Os prazos de validade após abertura indicados pelas marcas variaram entre 3 e 7 dias, sendo a mediana de 5 dias. A mediana da diferença de tempo entre a análise e a fabricação foi de 9 dias, com mínimo de 3 dias e máximo de 27 dias.

Todas as marcas com exceção da marca J informaram uma temperatura de armazenamento de até 8 °C, em conformidade com a temperatura regulamentada pela Portaria MAPA nº 352/1997. A marca J foi a única que informou uma temperatura de armazenamento de até 5 °C e, ainda que a amostra J1 estivesse fora da temperatura recomendada pelo fabricante, ela foi analisada por estar armazenada a uma temperatura de até 8 °C.

A análise das 39 medições de temperaturas indica uma taxa de não conformidade de 15% e que 50% das temperaturas estavam no intervalo de 5,7 °C a 7,6 °C, com mediana de 7,1 °C. Foram observados valores atípicos de temperatura tanto baixas - 2,5 °C - quanto altas - 14,8 °C, 16,2 °C e 19,0 °C.

As temperaturas atípicas e elevadas encontradas nas redes R08 de Copacabana e R09 de Botafogo demonstram a ausência de controle efetivo da temperatura de comercialização, não sendo possível determinar as causas especiais. A temperatura atípica de 2,5 °C encontrada na rede R11, ao se analisar somente as temperaturas das amostras coletadas, perde sua característica de valor atípico, o que indica que a rede armazena o queijo a uma baixa temperatura,

discrepante dos demais estabelecimentos, mas que tal temperatura estaria dentro da faixa esperada caso não fossem encontrados queijos com temperatura acima de 8 °C, ou seja, fora da condição de temperatura normatizada. Cabe, portanto, a análise das temperaturas acima de 8 °C: 9,0 °C, 9,3 °C e 10,1 °C, observadas respectivamente nas redes R05, R06 e R10, todas em Copacabana.

Sousa; Faria; Neves (2003) observaram que as temperaturas nos balcões refrigerados de queijos e embutidos em Palmas/TO não eram uniformemente distribuídas. Estudos demonstram a existência de variação da temperatura nos balcões refrigerados inclusive com modelagens matemáticas das distribuições de temperaturas durante as etapas da cadeia-do-frio (EVANS; SCARCELLI; SWAIN, 2007; LAGUERRE; HOANG; FLICK, 2013, 2012). A variação da temperatura deve-se a vários fatores como o tipo do balcão (vertical ou horizontal), a posição do produto no balcão, as flutuações da temperatura e umidade relativa do ambiente, as condições do entorno do balcão, a incidência de luz (EVANS; SCARCELLI; SWAIN, 2007; LAGUERRE; HOANG; FLICK, 2013, 2012; SOUSA; FARIA; NEVES, 2003). Tanto para os balcões refrigerados abertos quanto para os fechados, a maior parte das temperaturas mais elevadas se encontra na parte frontal do balcão (EVANS; SCARCELLI; SWAIN, 2007).

A rede 05 no bairro de Copacabana apresentou 04 de 05 medições dentro do parâmetro de temperatura, sendo a temperatura de 9,0 °C a única acima do parâmetro, o que poderia indicar que a temperatura estivesse ajustada para 8 °C, mas que ocorreu a variação de temperatura para acima de 8 °C em determinados pontos do balcão refrigerado. Seria possível também que as temperaturas dos balcões de refrigeração das redes R06 e R10 estivessem calibradas para manter os produtos a até 10 °C, observada a precisão de 1,5% do termômetro para a temperatura de 10,1 °C na rede R10. No entanto, somente com os dados obtidos, não é possível concluir quais são as causas das temperaturas de 9,0 °C, 9,3 °C e 10,1 °C, uma vez que não foram levantados os perfis de temperatura dos balcões refrigerados.

De fato, a taxa de não conformidade observada de 15% foi inferior às observadas por André; Sturion (2015), de 83,9%, e pelo (INMETRO, 2006), corrigido, de 67%, o que indica um melhor controle de temperatura pelos estabelecimentos deste estudo. No entanto, ao se considerar a possibilidade de

variação da temperatura em diferentes pontos do balcão, a verificação de temperaturas próximas e acima de 8 °C implica na necessidade da reavaliação do controle de temperatura nos balcões refrigerados. Para melhor avaliação das condições de temperatura de armazenagem seria recomendado um levantamento de perfil de temperatura de cada balcão refrigerado e a indicação da localização do produto.

5.2 *S. maltophilia*

A análise de especificidade *in silico* mostra uma elevada especificidade dos *primers* de Gallo et al. (2013) e uma baixa especificidade dos *primers* de Whitby et al. (2000), com possibilidade de formação de bandas inespecíficas – 527 pb, 530 pb, 531 pb e 532 pb – relacionadas a outros microrganismos na mesma região que as bandas específicas de *S. maltophilia* - 529 pb, 532 pb, 533 pb e 536 pb. A análise também permitiu verificar a existência de 01 a 04 cópias do gene 23S rRNA no genoma da *S. maltophilia*.

O problema de reação cruzada dos *primers* de Whitby et al. (2000) com microrganismos de outros gêneros, gerando resultados falso-positivos, foi anteriormente reportado por Foster et al. (2008) com bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. e por Pinot et al. (2011) com *Stenotrophomonas rhizophila*, *Variovorax* sp. e *Dyella japonica*. Igualmente observado por Pinot et al. (2011), o protocolo de Whitby et al. (2000) não é, portanto, adequado para identificação de *S. maltophilia* em comunidade de microrganismos, o que o limita sua utilização em detecção em alimentos.

A formação de bandas de tamanhos superiores aos esperados, com diferença de aproximadamente 100 pb, para os protocolos de Gallo et al. (2013) e de Whitby et al. (2000) não foi prevista.

Os genes ribossomais 23S rRNA e 16S rRNA são frequentemente utilizados para análise filogenética (PEI et al., 2009, 2010). Vários procariontes apresentam múltiplas cópias do gene 16S rRNA (PEI et al., 2010). Igualmente, o estudo de Pei et al. (2009) identificou a existência de múltiplas cópias do gene 23S rRNA em diversas espécies procariontes, de 257 espécies, 184 possuíam de 2 a 15 cópias do gene 23S rRNA, com mediana de 4,57 cópias. Foram encontradas divergências entre os

genes rRNA em 63% dos genomas, com média de variação de 0,4% e intervalo de 0,01% a 4,04%. Além disso, a possibilidade da presença de sequências intervenientes no gene 23S rRNA com tamanhos variando de 9 a 1471 nucleotídeos foi constatada em sete espécies.

A reação de PCR é sujeita a formação de artefatos como heteroduplex e quimeras, aumentando a quantidade de sinais e que podem levar à análise incorreta de resultados (KANAGAWA, 2003; V. WINTZINGERODE; GÖBEL; STACKEBRANDT, 1997).

A utilização de um gene que possua somente uma cópia no genoma é importante na análise de comunidade de microrganismos, uma vez que permite uma avaliação mais precisa da diversidade, da quantidade e da filogenética (CASE et al., 2007; CROSBY; CRIDDLE, 2003; DAHLLÖF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000).

A análise molecular utilizando um gene que está presente em múltiplas cópias em um mesmo genoma, como por exemplo o gene 16S rRNA, pode apresentar vieses devido à presença de heterogeneidade entre as cópias do gene, uma vez que cada cópia pode ter evoluído diferentemente (CASE et al., 2007; CROSBY; CRIDDLE, 2003; DAHLLÖF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000; UEDA et al., 1999). A heterogeneidade de múltiplas cópias pode gerar múltiplos sinais para um mesmo organismo ou combinar sinais de diferentes organismos em um único sinal, dependendo do tipo de técnica de análise molecular utilizada (CROSBY; CRIDDLE, 2003).

Devido à presença de múltiplas cópias do gene 23S, há uma elevada possibilidade da ocorrência da junção de fragmentos de genes por Overlap Extension PCR (HIGUCHI; KRUMMEL; SAIKI, 1988; HORTON et al., 1989), onde os fragmentos dos genes são emendados durante a reação de PCR, gerando um produto híbrido e maior do que o esperado.

No entanto, somente com o devido sequenciamento do produto da reação de PCR será possível definir a alteração ocorrida. Portanto, decidiu-se não prosseguir nas análises de identificação de *S. maltophilia* em queijo, uma vez que não se obteve resultado satisfatório da análise de especificidade do *primer* de Gallo et al. (2013) com a cepa ATCC 13637 de *S. maltophilia*, o que geraria erro nas análises.

5.3 *P. aeruginosa*

A análise de especificidade *in silico* mostra uma elevada especificidade dos primers de Choi et al. (2013) para *P. aeruginosa* e no genoma o gene O-antígeno acetilase aparece em somente uma cópia. A especificidade dos primers de Spilker et al. (2004) também foi relativamente elevada, sendo o gênero *Pseudomonas* spp. correspondente a 96,2% do total de entradas, excluídas as entradas de microrganismos não cultivados sem a identificação do gênero. Deve-se, no entanto, ressaltar a possível identificação de *Azobacter* spp., *Ochrobactrum* spp., *Psychrobacter* spp. ou *Marinobacter* spp., uma vez que os tamanhos de seus produtos se encontram na mesma região dos produtos de *Pseudomonas* spp. Cabe destacar também a extensa variação possível do tamanho dos produtos de *Pseudomonas* spp., variando de 545 pb a 630 pb.

A análise de PCR do DNA total apresentou uma taxa de identificação de 52% para o gênero *Pseudomonas* spp. e, para a espécie *P. aeruginosa*, somente a amostra I2 (3%) apresentou resultado positivo.

Das 360 colônias que cresceram no ágar cetrimide apenas 58 (16%) foram identificadas como do gênero *Pseudomonas* spp. e somente 26 (7%) foram identificadas como *P. aeruginosa*, demonstrando que o ágar cetrimide permitiu o crescimento de outras espécies de *Pseudomonas* spp. que não a *P. aeruginosa*, além de outras bactérias não identificadas, que não do gênero *Pseudomonas* spp. A *P. aeruginosa* correspondeu a 45% das colônias do gênero *Pseudomonas* spp.

A não identificação de *Pseudomonas* spp. no DNA total das amostras H1, G2 e Q2, e de *P. aeruginosa* no DNA total das amostras H1, E2 e J2, conjuntamente com identificação positiva após o cultivo em placas, demonstra que o número de moléculas de DNA alvo presente no DNA total das amostras se encontrava abaixo dos limites de detecção dos protocolos de Spilker et al. (2004) e Choi et al. (2013), e que as células apresentaram viabilidade e cultivabilidade nas condições adequadas de crescimento. Tal fato é importante, pois as análises incorreriam em falsos negativos caso fossem analisados somente os DNAs totais das amostras,.

A detecção de *Pseudomonas* spp. no DNA total das amostras E1, F1, J1, K1, L1, M1, A2 e F2, sem, no entanto, apresentar qualquer identificação positiva após cultivo em placas, requer estudos mais aprofundados. Ainda que a utilização de ágar

cetrimide para crescimento das colônias possa ser um limitante devido à inibição do crescimento de algumas espécies de *Pseudomonas* spp., há a possibilidade da ocorrência de células de *Pseudomonas* spp. no problemático estado VBNC, ou seja, em estado viável, mas não cultivável.

O estado VBNC é motivo de preocupação recente na segurança dos alimentos uma vez que as bactérias nesse estado não são cultiváveis e, conseqüentemente, não são detectáveis pelos métodos tradicionais de cultivo, sendo, no entanto, metabolicamente ativas e capazes de causar infecções (AYRAPETYAN; OLIVER, 2016; FAKRUDDIN; MANNAN; ANDREWS, 2013). Nesse estado de dormência, a integridade das membranas celulares é mantida e há baixos níveis de expressão gênica, mas quando o microrganismo é transferido a um meio sólido de cultivo não há formação de colônias (AYRAPETYAN; OLIVER, 2016). Esse estado pode ser induzido por processos frequentemente utilizados ou estudados para realizar o controle microbiológico dos produtos, tais como a utilização de luz pulsante, de CO₂ em alta pressão, de altas temperaturas, de conservantes alimentares e da pasteurização (AYRAPETYAN; OLIVER, 2016).

A *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas syringae* já foram descritas como bactérias que podem entrar em estado VBNC (AYRAPETYAN; OLIVER, 2016; FAKRUDDIN; MANNAN; ANDREWS, 2013; OLIVER, 2005). O estudo de Gunasekera et al., (2002) sugere a presença de uma população significativa de células em estado VBNC em leite pasteurizado e tanto células de *E. coli* quanto de *P. putida* são capazes de manter a expressão gênica quando no estado VBNC.

Não há, no entanto, dados de células em estado VBNC em queijos e a fim de se obterem esses dados, Caldera et al. (2015) desenvolveram uma metodologia de quantificação de células de *Pseudomonas* spp. cultiváveis, mortas e em estado VBNC em queijo muçarela utilizando método de cultivo em placas conjuntamente com qPCR e RT-qPCR com a cepa DSM 50106 de *P. fluorescens* como inóculo de controle do método. Os autores do método utilizaram os dados de qPCR e RT-qPCR para calcular a quantidade de células mortas e verificaram discrepâncias de valores entre as análises de contagem em placas e RT-qPCR, sendo a quantidade de células em estado VBNC calculada como a diferença entre esses valores. A

quantidade de células em estado VBNC no estudo de Caldera et al. (2015) variou entre 0 e 8,49, em escala logarítmica de UFC/g.

A Tabela 13 apresenta trabalhos de identificação de *Pseudomonas* spp. em queijos com dados referentes à amostragem, local de coleta das amostras e se o queijo analisado foi fabricado ou não com leite pasteurizado.

Tabela 13: Dados de trabalhos de identificação de *Pseudomonas* spp. em queijos

Referência	Amostra	Fabricado com Leite Pasteurizado	Local
El-Baradei; Delacroix-Buchet; Ogier (2007)	11 queijos <i>Domiati</i>	Não	Alexandria, Behira e Domiatta - Egito
Keskin; Ekmekçi (2007)	8 queijos	Sem informação	Izmir - Turquia
Hamouda; Vali; Amyes (2008)	22 produtos lácteos: leite, queijo e creme	Sem informação	Edimburgo - Escócia
Carvalho et al. (2009)	23 queijos Minas frescal caseiros e 23 industrializados	Industrializados - Sim Caseiros - Sem informação	Alfenas/MG - Brasil
Arslan; Eyi; Özdemir (2011)	140 queijos brancos artesanais produzidos através de métodos tradicionais	Sem informação Com frequência os queijos produzidos através de métodos tradicionais são feitos com leite cru	Bolu - Turquia
Castro (2012)	20 queijos Minas frescal	Sim	Indústria de laticínios da região central do Estado de São Paulo
Al-Shammary (2015)	40 queijos frescos	Não	Bagdá - Egito
Hammad (2015)	80 queijos <i>Domiati</i>	Não	El-Menofia - Egito
Escobar-Zepeda; Sanches-Flores; Quirasco Baruch (2016)	25 queijos <i>Cotija</i> Os queijos foram processados e 100 g de cada queijo foram homogeneizados, formando uma única amostra. Dessa amostra foram coletados 15 g.	Não	Tocumbo (5), Cotija (8), Quitupán (4), Jilotlán (4) e Santa María de Oro (4) – México
Este estudo (2016)	33 queijos Minas frescal	Sim	Rio de Janeiro/RJ – Brasil

A Tabela 14 detalha os métodos de identificação utilizados pelos estudos da Tabela 13 e apresenta os resultados obtidos.

Tabela 14: Detalhamento de trabalhos de identificação de *Pseudomonas* spp. em queijos

Referência	<i>P. aeruginosa</i>		Outras espécies de <i>Pseudomonas</i> spp.	
	Método	Resultado	Método	Resultado
El-Baradei; Delacroix- Bucht; Ogier (2007)	PCR com par de primers espécie-específico	0/11 (0%)	Amplificação da região V3 do gene 16s rRNA com eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) e comparação dos perfis com banco de dados	<i>P. putida</i> (1/11 – 9,1%) Banda que indica a presença de <i>E. faecium</i> , ou <i>P. fluorescens</i> , ou <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (9/11 – 81,8%) Banda que indica a presença de <i>Staphylococcus chromogenes</i> , ou <i>H. alvei</i> , ou <i>Pseudomonas alcaligenes</i> (1/11 – 9,1%)
Keskin; Ekmekçi (2007)	Testes bioquímicos	0/8 (0%)	Testes bioquímicos	<i>P. cepacia</i> (0/8 – 0%) <i>P. fluorescens</i> I (0/8 – 0%) <i>P. fluorescens</i> II (0/8 – 0%) <i>P. fluorescens</i> III (0/8 – 0%) <i>P. putida</i> (0/8 – 0%)
Hamouda; Vali; Amyes (2008)	PCR com par de primers espécie-específico	0/22 (0%)	-	-
Castro (2012)	PCR com par de primers espécie-específico	0/20 (0%)	Gênero <i>Pseudomonas</i> spp - Testes bioquímicos <i>P. fluorescens</i> - PCR com par de primers espécie-específico	<i>P. fluorescens</i> e outras espécies do gênero (1/20 -5%)
Escobar- Zepeda; Sanches- Flores; Quirasco Baruch (2016)	Sequenciamento do gene 16S rDNA – Biblioteca TruSeq kit v2, Sequenciador HiSeq2000/2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA)	0/25 (0%)	Sequenciamento do gene 16S rDNA – Biblioteca TruSeq kit v2, Sequenciador HiSeq2000/2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA)	<i>P. mendocina</i>
Carvalho et al. (2009)	Sem informação	46/46 (100%)	-	-
Arslan; Eyi; Özdemir (2011)	Testes bioquímicos	2/140 (1,4%)	Testes bioquímicos	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (21/140 – 15%) <i>P. alcaligenes</i> (7/140 – 5%) <i>P. fluorescens</i> biovar V (1/140 – 0,7%) <i>P. pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>citrulli</i> . (1/140 – 0,7%)

(continua)

Tabela 14: Detalhamento de trabalhos de identificação de *Pseudomonas* spp. em queijos

(conclusão)

Referência	<i>P. aeruginosa</i>		Outras espécies de <i>Pseudomonas</i> spp.	
	Método	Resultado	Método	Resultado
Al-Shammary (2015)	Kit bioquímico computadorizado e kit de aglutinação em látex	30/40 (75%)	-	-
Hammad (2015)	Sem informação	14/80 isolados (17,5%)	<i>P. fluorescens</i> – PCR com par de primers espécie-específico Demais – Sem informação	<i>P. fluorescens</i> (36/80 isolados - 45%) <i>P. putida</i> (12/80 isolados -15%) <i>P. syringae</i> (8/80 isolados - 10%) <i>P. alcaligenes</i> (6/80 isolados - 7,5%) Outras espécies do gênero (4/80 isolados - 5%)
Este estudo (2016)	PCR com par de primers espécie-específico	4/33 (12,1%)	PCR com par de primers gênero-específico	Sem identificação de espécie: do DNA total – 16/31 (51,6%) de colônias isoladas – 10/33 (30,3%)

Todas as 30 colônias de *P. aeruginosa* identificadas por Al-Shammary (2015) foram suscetíveis ao processamento do tipo LTLT, mas 40% apresentaram tolerância ao tratamento HTST. O perfil de tolerância ao pH mostrou que 23,3% toleraram o pH 5,0 e 10% o pH 2,0. Além disso, 10 isolados apresentaram tolerância à salmoura 3%, 8 isolados à salmoura 5%, 7 isolados à salmoura 7%.

A incidência de *Pseudomonas* spp. isoladas por Hammad (2015) que apresentaram crescimento a 7 °C foi de 72,5%. Além disso, 61,2% dos isolados apresentaram produção de protease, lipase e lecitinase, 26,2% apresentaram produção de protease e lipase, 10% apresentaram produção de protease e lecitinase, e 2,5% apresentaram produção somente de lecitinase.

Os estudos de Al-Shammary (2015) e Hammad (2015) utilizaram queijos produzidos com leite cru, e Arslan; Eyi; Özdemir (2011) utilizaram queijos que frequentemente são produzidos com leite cru. A presença de *P. aeruginosa* nesses estudos pode estar vinculada à ausência de tratamento térmico da matéria-prima e, mesmo assim, a diferença da taxa de identificação entre os estudos foi extremamente elevada. Essa diferença também pode ser observada entre os estudos de Hammad (2015) e El-Baradei; Delacroix-Buchet; Ogier (2007) que,

apesar de utilizarem o mesmo tipo de queijo, não foi identificada *P. aeruginosa* no último estudo. A ausência de tratamento térmico não explica totalmente a presença de *P. aeruginosa*, uma vez que o estudo de Escobar-Zepeda; Sanches-Flores; Quirasco Baruch (2016), feito com queijos produzido com leite cru, também não apresentou identificação de *P. aeruginosa*.

Ainda que o estudo de Castro (2012) não tenha identificado *P. aeruginosa* em queijos Minas frescal, o estudo de Carvalho et al. (2009) informa a identificação de *P. aeruginosa* em 100% das amostras de queijo Minas frescal, tanto de origem caseira quanto industrial. É possível que haja utilização de leite cru, ainda que de forma indevida e ilegal, nas amostras de origem caseira, mas o fato da identificação ter sido positiva também nas amostras de origem industrial alerta à possibilidade da presença de *P. aeruginosa* em queijos produzidos com leite pasteurizado. Tal possibilidade é corroborada pelo estudo de Al-Shammary (2015), que identificou cepas de *P. aeruginosa* que toleraram o processo HTST.

Neste estudo, a *P. aeruginosa* foi identificada através de PCR em quatro amostras - H1, E2, I2 e J2 – correspondendo a 12% do total de amostras. Todas apresentavam selo de inspeção do SIF, o que indica, em princípio, a utilização de pasteurização na produção do queijo. Todas as amostras positivas estavam em temperatura adequada, são provenientes de distintos fabricantes, regiões, estabelecimentos e dias de coleta, sendo 02 amostras obtidas da rede R05, porém de bairros diferentes.

Não foi possível, portanto, inferir que haja uma maior incidência de *P. aeruginosa* em determinada região ou que características de armazenamento de determinado estabelecimento influenciaram na identificação de *P. aeruginosa*, ainda que a temperatura influencie na velocidade de crescimento microbiano. Tampouco foi possível inferir que ocorra contaminação frequente da produção, uma vez que nenhuma marca apresentou identificação positiva concomitantemente em suas duas amostras distintas.

É fato, no entanto, que a *P. aeruginosa* mantém sua culturabilidade quando as amostras são mantidas na temperatura de refrigeração observada, ou seja, variando de 4,6 °C a 7,6 °C. A definição de *P. aeruginosa* por Colwell (1965) informa a ausência de crescimento nas temperaturas de 0 °C a 5 °C, sendo importante observar que as cepas utilizadas no estudo foram a ATCC 14216 e ATCC 14209. A

grande diversidade das cepas e a grande capacidade de adaptação do microrganismo ao ambiente merecem, portanto, atenção.

Em complementação ao estudo de Mallet (2007), que não identificou *P. aeruginosa* nas águas de propriedades leiteiras no período da primavera, três amostras positivas deste estudo foram produzidas no período da primavera e somente uma no inverno. Para identificar a influência do clima e da origem da contaminação, seria necessário, portanto, o levantamento de amostras ambientais e de produção durante todo o processo fabril por um ciclo inteiro de estações.

Com exceção das amostras I2 e E2, em que todos os isolados de *Pseudomonas spp.* foram identificados como *P. aeruginosa*, observa-se a presença de outras espécies de *Pseudomonas* nas amostras, representados por 32 de 58 isolados (55%). Valor consideravelmente menor do que os encontrados para espécies de *Pseudomonas* que não a *P. aeruginosa* por Arslan; Eyi; Özdemir (2011), 93,8%, e Hammad (2015), 82,5%.

Uma diferença entre esses estudos e o presente estudo é a utilização de leite pasteurizado na produção do queijo Minas frescal. A pasteurização reduz a microbiota presente no leite cru, inclusive de espécies do gênero *Pseudomonas*, e caso haja espécies mais termossensíveis, estas sofrerão uma maior redução populacional ou até a eliminação. Outra possível variação é a utilização pelos dois estudos de *Pseudomonas* ágar base suplementado com os antibióticos ceftrimida, ácido fusídico e cefaloridina, para crescimento das colônias enquanto este estudo utilizou o ágar ceftrimide.

Observa-se a frequente identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* nos diversos estudos e principalmente das espécies *P. fluorescens* e *P. putida*. O estudo de Hammad (2015) indica a produção de proteases e lipases pelas cepas de *Pseudomonas spp.*, logo, um queijo que possua quantidades significativas de microrganismos produtores dessas enzimas pode apresentar defeitos de aroma, sabor e estrutura e um decaimento rápido de sua vida-de-prateleira.

6 CONCLUSÃO

O levantamento das temperaturas dos produtos indicou um razoável controle da temperatura pelos estabelecimentos visitados neste estudo, sendo que a maior parte das medições de temperatura (33/39) foi de até 8 °C.

O estudo de detecção de *S. maltophilia* não foi realizado. Os *primers* espécie-específicos de Whitby et al. (2000) apresentaram baixa especificidade para o microrganismo alvo com possíveis falso-positivos para bactérias inclusive de outros gêneros. O protocolo de Gallo et al. (2013) apresentou a formação de banda com tamanho acima do esperado para a cepa ATCC 13637 e o genoma da *S. maltophilia* possui até 4 cópias do gene 23S rRNA, o que pode causar a junção de fragmentos de genes por Overlap Extension PCR, gerando erro nas análises.

A *P. aeruginosa* foi detectada em 4 de 33 queijos Minas frescal, o que demonstra que mesmo se o queijo for adquirido em estabelecimento comercial devidamente formalizado, possua carimbo de inspeção, esteja íntegro, dentro do período de validade e dentro das condições de temperatura recomendadas, há risco para a saúde da população suscetível no consumo de queijo Minas frescal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a coleta das amostras foram observadas práticas recorrentes do fracionamento do produto e da retirada do soro da embalagem principal, que não foram objetos deste estudo. Alerta-se que os utensílios utilizados nessas ações também podem contaminar o produto.

Considerando os valores de temperatura obtidos nos estabelecimentos e a temperatura normatizada, futuros estudos de vida-de-prateleira ou de utilização de novas tecnologias no processamento de queijo Minas frescal para fins de controle de microbiota devem ser realizados também a 8 °C.

Uma vez que a empresa é responsável por determinar o prazo de validade e garantir a qualidade do produto durante o período e que a validade do queijo variou entre 15 e 82 dias, estudos de modelagem matemática da temperatura nas diferentes etapas da cadeia-do-frio como o de Laguerre; Hoang; Flick (2012), ainda que complexos, podem auxiliar a prever uma vida-de-prateleira mais adequada para os produtos.

A produção de vários tipos de enzimas de degradação em uma grande amplitude de temperatura pelo gênero *Pseudomonas* spp. o torna importante para os estudos de controle microbiológico de produtos refrigerados. No entanto, ainda que tais características sejam indesejadas na cadeia de alimentos, a produção dessa diversidade de enzimas com diferentes aplicações pode ser de interesse para outras áreas de aplicações tecnológicas.

A análise de microrganismos patógenos e indicadores clássicos permite uma análise de segurança dos alimentos praticável laboratorialmente, no entanto, estudos que visam a proteção da saúde da população suscetível devem estar cientes que a ausência de um microrganismo nos padrões microbiológicos de alimentos não significa, necessariamente, a ausência do microrganismo no alimento e que patógenos oportunistas podem estar presentes no alimento, ainda que este esteja com os parâmetros dentro da conformidade legal.

A análise de segurança de um alimento para a população suscetível que somente considere os patógenos comuns e os previstos na legislação pode levar a uma exposição não-intencional, mas perigosa, a patógenos oportunistas, colocando em risco a saúde dessa população. A habilidade das bactérias patógenas

oportunistas de se adaptar a novos hospedeiros, persistir no meio-ambiente, resistir a antibióticos e modificar seu perfil de virulência através de sistemas de *quorum sensing* deve ser levada em consideração.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M.; FARIAS, P. G.; PAIVA, G. S.; ALMEIDA, A. M.; MORAIS, P. V. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 118, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24885173>>.
- ALLYDICE-FRANCIS, K.; BROWN, P. D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. ID 426241, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2012/426241/>>.
- ALMEIDA, V. F. S.; OLIVEIRA, S. R.; JÁCOME, P. R. L. A.; JÁCOME-JÚNIOR, A. T. Avaliação de indicadores higiênico-sanitários e das características físico-químicas em águas utilizadas em escolas públicas de nível fundamental. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 334–340, 2009. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6638/6630>>.
- AL-SHAMMARY, A. H. A. The effect of heat treatment, pH and osmotic pressure on viability of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw dairy products in Baghdad. **B. International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 3, p. 675–681, 2015.
- ANDRÉ, P. S.; STURION, G. L. Condições de comercialização de queijos em varejões do município de Piracicaba – SP. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 22, n. 19, p. 644–653, 2015. Disponível em: <<http://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8641600/9099>>.
- ANUJ, S. N.; WHILEY, D. M.; KIDD, T. J.; BELL, S. C.; WAINWRIGHT, C. E.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 63, n. 2, p. 127–31, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889308004185>>. Acesso em: 6 abr. 2016.
- APISARNTHANARAK, A.; FRASER, V. J.; DUNNE, W. M.; LITTLE, J. R.; HOPPE-BAUER, J.; MAYFIELD, J. L.; POLISH, L. B. *Stenotrophomonas maltophilia* intestinal colonization in hospitalized oncology patients with diarrhea. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 8, p. 1131–1135, 2003. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/37/8/1131.full>>.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação Da Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Produzido Por Laticínios Do Estado De Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433–442, 2014. Disponível em: <<http://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/290>>.
- ARSLAN, S.; EYI, a; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance

of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 12, p. 5851–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118075>>.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 180–185, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01966.x>>.

AYRAPETYAN, M.; OLIVER, J. D. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 127–133, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799316300625>>. Acesso em: 13 maio. 2016.

BEN-GIGIREY, B.; SOUSA, J. M. V. B.; VILLA, T. G.; BARROS-VELAZQUEZ, J. Characterization of biogenic amine-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from white muscle of fresh and frozen albacore tuna. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, n. 1-2, p. 19–31, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160500002403>>.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, 1 nov. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>>.

BERG, G.; ERLACHER, A.; SMALLA, K.; KRAUSE, R. Vegetable microbiomes: is there a connection among opportunistic infections, human health and our “gut feeling”? **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 487–495, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12159>>.

BERG, G.; MARTINEZ, J. L. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. March, p. 241, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4379930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BHANDERI, B. B.; JHALA, M. K.; AHIR, V. B.; BHATT, V. D.; JOSHI, C. G. Cultural and metagenomic based identification of a microbiome from subclinical mastitis in cows. **VETERINARSKI ARHIV**, v. 84, n. 3, p. 215–228, 2014. Disponível em: <<http://www.vef.unizg.hr/vetarhiv/papers/2014-84-3-2.pdf>>.

BONFILIO, R.; SANTOS, O. M. M.; NOVAES, Z. R.; MATINATTI, A. N. F.; ARAÚJO, M. B. Controle de qualidade físico-químico e microbiológico em 2347 amostras manipuladas em 2010 e 2011. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n. 4, p. 527–535, 2013. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/2515/1491>.

BOYLE, N. M.; PODCZERVINSKI, S.; JORDAN, K.; STEDNICK, Z.; BUTLER-WU, S.; MCMILLEN, K.; PERGAM, S. a. Bacterial Foodborne Infections after

Hematopoietic Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 11, p. 1856–1861, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.06.034>>.

BRANDÃO, M. L. L.; ROSAS, C. D. O.; MEDEIROS, V. D. M.; WARNKEN, M. B.; BRICIO, S. M. L.; SILVA, A. M. L. Da; AZEREDO, D. R. P. Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 32–39, 2012. Disponível em: <http://www.arca.fiocruz.br/bitstream/iciict/8797/2/RIAL_71_32-39.PDF>.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília, DF: Senado Federal, 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 26 de agosto de 2014.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm>. Acesso em: 26 de setembro de 2014.

BRASIL. Resolução CISA/MA/MS nº 10, de 31 de julho de 1984. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de agosto de 1984. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/10_84.htm>. Acesso em: 01 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, 11 de março de 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, 08 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1220>>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 28 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

BRAUN, L. E.; CHEN, H.; FRANGOUL, H. Significant inconsistency among pediatric oncologists in the use of the neutropenic diet. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 10, p. 1806–1810, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938730>>.

BRITO, J. R. F.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4954–4961, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2519366/>>.

BROOKE, J. S. Pathogenic bacteria in sink exit drains. **The Journal of hospital infection**, v. 70, n. 2, p. 198–9, out. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670108002740>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 2–41, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255966/>>.

CALDERA, L.; ARIOLI, S.; STUKNYTĖ, M.; SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L. Setup of a rapid method to distinguish among dead, alive, and viable but not cultivable cells of *Pseudomonas* spp. in mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8368–8374, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030215006979>>.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142–153, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001896>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

CALLON, C.; DUTHOIT, F.; DELBÈS, C.; FERRAND, M.; LE FRILEUX, Y.; DE CRÉMOUX, R.; MONTEL, M. C. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 547–560, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202007000719>>.

CARR, S. E.; HALLIDAY, V. Investigating the use of the neutropenic diet: a survey of UK dietitians. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 28, n. 5, p. 510–515, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jhn.12266>>.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. Disponível em:

<<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000293690>>. Acesso em 24 de outubro de 2014.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262–267, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505002331>>.

CARVALHO, P. L. N.; CARVALHO, P. R.; HOFER, E.; REIS, C. M. F.; VEIGA, S. M. O. M. Research about *Listeria* sp., *Salmonella* sp. And Others Contamination Indicators to Milk's and Cheese's Samples Sale in the South of Minas Gerais State. **Aust. J. Basic & Appl. Sci.**, v. 3, n. 4, p. 4422–4431, 2009. Disponível em: <<http://ajbasweb.com/old/ajbas/2009/4422-4431.pdf>>.

CASTRO, M. S. R. **Enterococcus spp. e Pseudomonas spp. isolados de ambiente de processamento de produtos lácteos: identificação, formação de biofilmes multi-espécies e controle por agentes sanitizantes**. 2012. 257 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000895117&fd=y>>. Acesso em 10 de maio de 2016.

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278–288, 1 jan. 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/1/278.full#T1>>. Acesso em: 30 mar. 2015.

CERVIA, J. S.; FARBER, B.; ARMELLINO, D.; KLOCKE, J.; BAYER, R.-L.; MCALISTER, M.; STANCHFIELD, I.; CANONICA, F. P.; ORTOLANO, G. A. Point-of-use water filtration reduces healthcare-associated infections in bone marrow transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 3, p. 238–241, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2009.00459.x>>.

CHEN, K.-H.; CHEN, L.-R.; WANG, Y.-K. Contamination of Medical Charts: An Important Source of Potential Infection in Hospitals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e78512, 18 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928153/>>.

CHERIF-ANTAR, A.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; DIDOUH, N.; MEDJAHDI, K.; MAYO, B.; FLÓREZ, A. B. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13594-015-0235-4>>.

CHOI, H. J.; KIM, M. H.; CHO, M. S.; KIM, B. K.; KIM, J. Y.; KIM, C.; PARK, D. S. Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3643–51, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504075>>. Acesso em: 6 abr. 2016.

CHUANG, C.-H.; WANG, Y.-H.; CHANG, H.-J.; CHEN, H.-L.; HUANG, Y.-C.; LIN, T.-Y.; OZER, E. A.; ALLEN, J. P.; HAUSER, A. R.; CHIU, C.-H. Shanghai fever: a distinct *Pseudomonas aeruginosa* enteric disease. **Gut**, v. 63, n. 5, p. 736–43, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3995289&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CLETO, S.; MATOS, S.; KLUSKENS, L.; VIEIRA, M. J. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e40189, 2012. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040189>>.

COLWELL, R. R. PROPOSAL OF A NEOTYPE, ATCC 14216, FOR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (SCHROETER 1872) MIGULA 1900 AND REQUEST FOR AN OPINION. **International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy**, v. 15, n. 2, p. 87–95, 1965. Disponível em:

<<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-15-2-87>>.

COTON, M.; DELBÉS-PAUS, C.; IRLINGER, F.; DESMASURES, N.; LE FLECHE, A.; STAHL, V.; MONTEL, M. C.; COTON, E. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 88–98, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.020>>.

CROSBY, L. D.; CRIDDLE, C. S. Understanding Bias in Microbial Community Analysis Techniques due to rrn Operon Copy Number Heterogeneity.

BioTechniques, v. 34, n. 4, p. 790–802, 2003. Disponível em:

<<http://web.stanford.edu/group/evpilot/pdf/crosby344.pdf>>.

CROSSMAN, L. C.; GOULD, V. C.; DOW, J. M.; VERNIKOS, G. S.; OKAZAKI, A.; SEBAIHIA, M.; SAUNDERS, D.; ARROWSMITH, C.; CARVER, T.; PETERS, N.; ADLEM, E.; KERHORNOU, A.; LORD, A.; MURPHY, L.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; RUTTER, S.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; THOMSON, N. R.; AVISON, M. B. The Complete Genome, Comparative and Functional Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* Reveals an Organism Heavily Shielded by Drug Resistance Determinants. **Genome biology**, v. 9, n. 4, p. R74, 17 jan. 2008. Disponível em:

<<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-4-r74>>.

Acesso em: 17 mar. 2016.

CUTTELOD, M.; SENN, L.; TERLETSKIY, V.; NAHIMANA, I.; PETIGNAT, C.; EGGIMANN, P.; BILLE, J.; PROD'HOM, G.; ZANETTI, G.; BLANC, D. S. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1998–2007). **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 1, p. 57–62, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121820>\n<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1469-0691.2010.03164.x/asset/j.1469-0691.2010.03164.x.pdf?v=1&t=hizsgd6h&s=f633c0fcd72a8a4b6577e753ed09fb97ac95a97f>>.

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3376–3380, 1 ago. 2000. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/66/8/3376.full>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

DAMASCENO, E. I. T.; PANTOJA, L. N. G.; FIGUEIREDO, H. M.; SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. C. Microbiota of two species of commercially important fish in the Amazon region (Belém-Pará-Brazil): Butterfly peacock bass (*Cichla ocellaris*) and piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 9, p. 572–580, 2015. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/C3B86B451017>>.

DELBÈS, C.; ALI-MANDJEE, L.; MONTEL, M. C. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1882–1891, 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/6/1882.full>>.

DENTON, M.; KERR, K. G. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 1, p. 57–80, 1 jan. 1998. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/11/1/57.short>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

DENTON, M.; RAJGOPAL, A.; MOONEY, L.; QURESHI, A.; KERR, K. .; KEER, V.; POLLARD, K.; PECKHAM, D. .; CONWAY, S. *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. **Journal of Hospital Infection**, v. 55, n. 3, p. 180–183, nov. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670103002998>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

DENTON, M.; TODD, N. J.; KERR, K. G.; HAWKEY, P. M.; LITTLEWOOD, J. M. Molecular Epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolated from Clinical Specimens from Patients with Cystic Fibrosis and Associated Environmental Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1953–1958, 18 jul. 1998. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/36/7/1953.full>>.

EFSA BIOHAZ PANEL (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. **EFSA Journal**, n. 765, p. 1–87, 2008. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/765>>.

EFSA BIOHAZ PANEL (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 9, n. 8, p. 1–95, 2011. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>.

EFSA BIOHAZ PANEL (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. **EFSA Journal**, v.

11, n. 12, p. 1–70, 2013. Disponível em:
<<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3501>>.

EL-BARADEI, G.; DELACROIX-BUCHET, A.; OGIER, J.-C. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 4, p. 1248–55, 15 fev. 2007. Disponível em:
<<http://aem.asm.org/content/73/4/1248.full>>. Acesso em: 9 maio. 2016.

EL-ROOS, N. A. A.; MAZID, E. M.; ZAKARY, E. M.; YAZID, K. F. A. EI. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATED FROM MILK. **Assiut Vet. Med. J.**, v. 59, n. 139, p. 14–22, 2013. Disponível em: <http://www.aun.edu.eg/journal_files/119_J_1766.pdf>.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; QUIRASCO BARUCH, M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food Microbiology**, v. 57, p. 116–127, ago. 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016000113>>. Acesso em: 19 mar. 2016.

EVANS, J. A.; SCARCELLI, S.; SWAIN, M. V. L. Temperature and energy performance of refrigerated retail display and commercial catering cabinets under test conditions. **International Journal of Refrigeration**, v. 30, n. 3, p. 398–408, 2007.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. Bin; ANDREWS, S. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. **ISRN Microbiology**, v. 2013, n. Article ID 703813, p. 6 pages, 2013. Disponível em:
<<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/703813/abs/>\n<http://downloads.hindawi.com/journals/isrn/2013/703813.pdf>\n<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/703813/>>.

FALAGAS, M. E.; KASTORIS, A. C.; VOULOUMANOU, E. K.; RAFAILIDIS, P. I.; KAPASKELIS, A. M.; DIMOPOULOS, G. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. **Future microbiology**, v. 4, p. 1103–1109, 2009. Disponível em:
<<http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fmb.09.84>>.

FAUCHER, S. P.; CHARETTE, S. J. Editorial on: Bacterial pathogens in the non-clinical environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 331, p. 1–2, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00331/full>>.

FDA (Food and Drug Administration). **Food Code**. Washington: Food and Drug Administration, 2013. 768p. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM374510.pdf>>. Acesso em 24 de setembro de 2014.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 3, p. 745–748, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000300031>>.

FOSTER, N. F.; HARNETT, G. B.; RILEY, T. V.; CHANG, B. J. Cross-reaction of *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* species in a 23S rRNA gene-directed PCR for detection of *S. maltophilia*. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 4111–3, 1 dez. 2008. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/46/12/4111>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

FRANZETTI, L.; SCARPELUNI, M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 39–47, 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-34147139531&partnerID=40>>.

GALLO, S. W.; FIGUEIREDO, T. P.; BESSA, M. C.; PAGNUSSATTI, V. E.; FERREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, S. D. Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, 23 mar. 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/mdr.2015.0306>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

GALLO, S. W.; RAMOS, P. L.; FERREIRA, C. A. S.; OLIVEIRA, S. D. de. A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 390–391, maio 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000300390&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 abr. 2016.

GARDNER, A.; MATTIUZZI, G.; FADERL, S.; BORTHAKUR, G.; GARCIA-MANERO, G.; PIERCE, S.; BRANDT, M.; ESTEY, E. Randomized comparison of cooked and noncooked diets in patients undergoing remission induction therapy for acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5684–5688, 2008. Disponível em: <<http://jco.ascopubs.org/content/26/35/5684.long>>.

GARÓFOLO, A. Neutropenic diet and quality of food: a critical analysis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 2, p. 79–80, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842013000200003&nrm=iso>.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/2049-632X.12033/full>>.

GERBA, C. P.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N. Sensitive populations: who is at the greatest risk? **Int. J. Food Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 113–123, 1996. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/14349825_Sensitive_populations_who_is_at_the_greatest_risk/links/0fcfd505b58509a2c5000000>.

GOMES, D. **Confiabilidade na Cadeia Produtiva do Leite**. Brasília: GICRA/ANVISA, 2013. 15 slides, colorido. Apresentado na Audiência Pública da Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento Rural n.

1413/13 em 17 de setembro de 2013. Disponível em:
<<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/capadr/audiencias-publicas/audiencias-publicas-2013/audiencia-publica-17-de-setembro-de-2013-anvisa>>. Acesso em 17 de novembro de 2014.

GOULD, L. H.; MUNGAI, E.; BARTON BEHRAVESH, C. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 7, p. 545–51, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24750119>>.

GUNASEKERA, T. S.; SØRENSEN, A.; ATTFIELD, P. V; SØRENSEN, S. J.; VEAL, D. A. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1988–93, abr. 2002. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=123843&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 maio. 2016.

HAGI, T.; SASAKI, K.; ASO, H.; NOMURA, M. Adhesive properties of predominant bacteria in raw cow's milk to bovine mammary gland epithelial cells. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 515–522, 2013. Disponível em:
<<http://link.springer.com/article/10.1007/s12223-013-0240-z>>.

HAMMAD, A. M. SPOILAGE POTENTIAL OF *PSEUDOMONAS* SPP . ISOLATED FROM DOMIATI CHEESE. **Assiut Vet. Med. J.**, v. 61, n. 147, p. 18–23, 2015.

HAMOUDA, A.; VALI, L.; AMYES, S. G. B. Gram-Negative Non-Fermenting Bacteria from Food-Producing Animals are Low Risk for Hospital-Acquired Infections. **Journal of Chemotherapy**, v. 20, n. 6, p. 702–708, 2008. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/joc.2008.20.6.702>>.

HELLMIG, S.; OTT, S.; MUSFELDT, M.; KOSMAHL, M.; ROSENSTIEL, P.; STÜBER, E.; HAMPE, J.; FÖLSCH, U. R.; SCHREIBER, S. Life-threatening chronic enteritis due to colonization of the small bowel with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 706–712, 2005. Disponível em:
<[http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(05\)00031-4/fulltext](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(05)00031-4/fulltext)>.

HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 15, p. 7351, 1988. Disponível em:
<<http://nar.oxfordjournals.org/content/16/15/7351.short>>.

HOEFEL, D.; MONIS, P. T.; GROOBY, W. L.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 175–186, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02573.x>>.

HORTON, R. M.; HUNT, H. D.; HO, S. N.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 61–68, 1989.

HUEDO, P.; YERO, D.; MARTINEZ-SERVAT, S.; RUYRA, À.; ROHER, N.; DAURA, X.; GIBERT, I. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 761, jan. 2015. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4517397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

HUGH, R.; RYSCHENKOW, E. *Pseudomonas maltophilia*, an Alcaligenes-like Species. **J. gen. Microbiol.**, v. 26, p. 123–132, 1961. Disponível em:

<<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-26-1-123>>.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). **Consenso nacional de nutrição oncológica**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 182p.

Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/consensonacional-de-nutricao-oncologica-2-edicao_2015_completo.pdf>. Acesso em 03 de maio de 2016.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia). **Programa de Análise de Produtos – Queijo Tipo Minas Frescal e Padrão**. 2006. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/queijo_Minas.asp>. Acesso em 25 de setembro de 2014.

JAKOBI, M.; WINKELMANN, G.; KAISER, D.; KEMPTER, C.; JUNG, G.; BERG, G.; BAHL, H. Maltophilin: A New Antifungal Compound Produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. **The Journal of Antibiotics**, v. 49, n. 11, p. 1101–1104, 1996.

Disponível em:

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/49/11/49_11_1101/_article>.

KANAGAWA, T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 317–323, 2003.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303901307>>.

KESKIN, D.; EKMEKÇI, S. Investigation of the Incidence of *Pseudomonas* sp. in Foods. **Hacettepe J. Biol. & Chem.**, v. 35, n. 3, p. 181–186, 2007. Disponível em:

<<http://www.hjbc.hacettepe.edu.tr/journal/volume-35/issue-3/investigation-of-the-incidence-of-Pseudomonas-sp-in-foods/index.html>>.

KHAN, N. H.; AHSAN, M.; TAYLOR, W. D.; KOGURE, K. Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbes and environments / JSME**, v. 25, n. 4, p. 266–274, 2010.

KHAN, N. H.; ISHII, Y.; KIMATA-KINO, N.; ESAKI, H.; NISHINO, T.; NISHIMURA, M.; KOGURE, K. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 2, p. 173–186, 2007.

KIM, Y. J.; JUN, Y. H.; KIM, Y. R.; PARK, K. G.; PARK, Y. J.; KANG, J. Y.; KIM, S. II. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. **BMC infectious**

diseases, v. 14, p. 161, 2014. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3994322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KOMINOS, S. D.; COPELAND, C. E.; GROSIK, B.; POSTIC, B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. **Applied microbiology**, v. 24, n. 4, p. 567–70, 1972. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=380614&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KOVALEVA, J.; DEGENER, J. E.; VAN DER MEI, H. C. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. **The Journal of hospital infection**, v. 76, n. 4, p. 345–50, dez. 2010. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670110003294>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

LAGUERRE, O.; HOANG, H. M.; FLICK, D. Experimental investigation and modelling in the food cold chain: Thermal and quality evolution. **Trends in Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 87–97, 2013. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.08.001>>.

LAGUERRE, O.; HOANG, M. H.; FLICK, D. Heat transfer modelling in a refrigerated display cabinet: The influence of operating conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 2, p. 353–364, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.07.027>>.

LAI, C.-H.; WONG, W.-W.; CHIN, C.; HUANG, C.-K.; LIN, H.-H.; CHEN, W.-F.; YU, K.-W.; LIU, C.-Y. Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 986–91, out. 2006. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14620280>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

LANINI, S.; D'AREZZO, S.; PURO, V.; MARTINI, L.; IMPERI, F.; PISELLI, P.; MONTANARO, M.; PAOLETTI, S.; VISCA, P.; IPPOLITO, G. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17064, 2011. Disponível em:
<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017064>>.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, v. 6, n. 1, p. 26–41, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>>.

LEPANTO, P.; LECUMBERRY, F.; ROSSELLO, J.; KIERBEL, A. A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 1, p. 1–5, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2013.10.001>>.

LEVY, C.; GARCIA, D. Capítulo 4: Bastonetes Gram-Negativos Não Fermentadores. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: Anvisa, 2013, p. 59 - 74. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e4f744804fe4db439634feece77a031c/Modulo+006.pdf?MOD=AJPERES&attachment=true&id=1370522495407>> . Acesso em 02 de agosto de 2014.

LIMA, J. R. O.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; SALGADO FILHO, N.; NUNES, P. C.; SILVA, H. S.; MONTEIRO, S. G.; COSTA, J. M. L. Microbiological analyses of water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil.

Brazilian Journal of Microbiology, v. 36, n. 2, p. 103–108, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000200001>.

LOVEDAY, H. P.; WILSON, J. a.; KERR, K.; PITCHERS, R.; WALKER, J. T.; BROWNE, J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 1, p. 7–15, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>>.

LU, Q.; EGGIMANN, P.; LUYT, C.-E.; WOLFF, M.; TAMM, M.; FRANÇOIS, B.; MERCIER, E.; GARBINO, J.; LATERRE, P.-F.; KOCH, H.; GAFNER, V.; RUDOLF, M. P.; MUS, E.; PEREZ, A.; LAZAR, H.; CHASTRE, J.; ROUBY, J.-J. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes.

Critical care, v. 18, n. 1, p. R17, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4057348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LUND, B. M. Microbiological food safety and a low-microbial diet to protect vulnerable people. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 6, p. 413–24, 2014.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24621274>>.

LUND, B. M.; O'BRIEN, S. J. The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 961–973, 2011. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2011.0860>>.

MADSEN, J. S.; BURMØLLE, M.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 183–195, 2012. Disponível em: <<http://femsim.oxfordjournals.org/content/65/2/183.long>>.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; STEPHAN, M. P.; EGITO, A. S.; DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v. 45, p. 22–28, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.012>>.

MAGIORAKOS, A.-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-

LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>.

MALLET, A. **QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* EM ÁGUAS DE PROPRIEDADES LEITEIRAS**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/2667>>. Acesso em 10 de maio de 2016.

MALLET, A.; GUÉGUEN, M.; KAUFFMANN, F.; CHESNEAU, C.; SESBOUÉ, A.; DESMASURES, N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **International Dairy Journal**, v. 27, n. 1-2, p. 13–21, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.009>>.

MARTÍNEZ, J. L. Short-sighted evolution of bacterial opportunistic pathogens with an environmental origin. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. May, p. 239, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4033005&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MARTÍNEZ, P.; HUEDO, P.; MARTINEZ-SERVAT, S.; PLANELL, R.; FERRER-NAVARRO, M.; DAURA, X.; YERO, D.; GIBERT, I. *Stenotrophomonas maltophilia* responds to exogenous AHL signals through the LuxR solo SmoR (Smlt1839). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 41, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4432800&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

MCGEENEY, L. M.; GATISS, G. A. A survey of food safety information and foodborne infections post solid organ transplant. **e-SPEN Journal**, v. 9, n. 6, p. e195–e199, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212826314000359>>.

MEDEIROS, L. C.; CHEN, G.; KENDALL, P.; HILLERS, V. N. Food safety issues for cancer and organ transplant patients. **Nutr Clin Care**, v. 7, n. 4, p. 141–148, 2004.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surtos de Gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no Estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 639–645, 2012. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/639/2092>>.

METAN, G.; HAYRAN, M.; HASCELIK, G.; UZUN, O. Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6-7, p. 527–531, 2006. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365540500452481>>.

MICEK, S. T.; WUNDERINK, R. G.; KOLLEF, M. H.; CHEN, C.; RELLO, J.; CHASTRE, J.; ANTONELLI, M.; WELTE, T.; CLAIR, B.; OSTERMANN, H.; CALBO, E.; TORRES, A.; MENICHETTI, F.; SCHRAMM, G. E.; MENON, V. An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: impact of multidrug resistance. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-0926-5>>.

MINKWITZ, A.; BERG, G. Comparison of Antifungal Activities and 16S Ribosomal DNA Sequences of Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 139–145, 20 Jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87693/>>.

MINOGUE, E.; TUIITE, N. L.; SMITH, C. J.; REDDINGTON, K.; BARRY, T. A rapid culture independent methodology to quantitatively detect and identify common human bacterial pathogens associated with contaminated high purity water. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/15/6>>.

MITTAL, R.; AGGARWAL, S.; SHARMA, S.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. **Journal of Infection and Public Health**, v. 2, n. 3, p. 101–111, 2009. Disponível em: <[http://www.jiph.org/article/S1876-0341\(09\)00058-6/fulltext](http://www.jiph.org/article/S1876-0341(09)00058-6/fulltext)>.

MODESTO, P. C.; LOPES, L. A.; NÓBREGA, F. J. Restrições dietéticas para pacientes neutropênicos: realmente necessárias? **Rev Bras Nutr Clin**, v. 25, n. 4, p. 330–333, 2010.

MONTANARI, L. B.; SARTORI, F. G.; CARDOSO, M. J. O.; VARO, S. D.; PIRES, R. H.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K.; MARTINS, C. H. G. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 51, n. 1, p. 37–43, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652009000100007>>.

MOODY, K.; FINLAY, J.; MANCUSO, C.; CHARLSON, M. Feasibility and safety of a pilot randomized trial of infection rate: neutropenic diet versus standard food safety guidelines. **Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 28, n. 3, p. 126–133, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/01.mph.0000210412.33630.fb>>.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 334–346, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305001242>>.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. Antibiotic resistance of raw-milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, v. 162, n. 2, p. 115–123, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501306000164>>.

NATHWANI, D.; RAMAN, G.; SULHAM, K.; GAVAGHAN, M.; MENON, V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 3, n. 1, p. 32, jan. 2014.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4219028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 maio. 2015.

NEPA (Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação). **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 4ª. Edição, 161 p. Disponível em:

<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>. Acesso em 28 de setembro de 2014.

NUNES, M. M.; MOTA, A. L. A. A.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 235–240, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.034>>.

O'DONNELL, M. J.; TUTTLEBEE, C. M.; FALKINER, F. R.; COLEMAN, D. C. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive biofilm. **The Journal of hospital infection**, v. 59, n. 4, p. 348–60, abr. 2005. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670104003998>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development); The Food And Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Agricultural Outlook Database 2014 – 2023**. 2015. Disponível em <<http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/database.htm>>. Acesso em 14 de maio de 2016.

OHNISHI, M.; SAWADA, T.; MARUMO, K.; HARADA, K.; HIROSE, K.; SHIMIZU, a.; HAYASHIMOTO, M.; SATO, R.; UCHIDA, N.; KATO, H. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of bovine *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a mastitis outbreak. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 572–576, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2012.03246.x>>.

OIE, S.; KIYONAGA, H.; MATSUZAKA, Y.; MAEDA, K.; MASUDA, Y.; TASAKA, K.; ARITOMI, S.; YAMASHITA, A.; KAMIYA, A. Microbial contamination of fruit and vegetables and their disinfection. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 10, p. 1902–1905, 2008. Disponível em:

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/31/10/31_10_1902/_article>.

OKURA, M. H.; MOACIR, J. AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE QUEIJOS MINAS FRESCAL PRODUZIDOS COM LEITE CRU, LEITE PASTEURIZADO E DEQUEIJO TEMPERADO EM ALGUNS MUNICÍPIOS DA REGIÃO DO TRIÂNGULO MINEIRO. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 65, n. 375, p. 33–42, 2010. Disponível em:

<<http://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/133/138>>.

OLIVEIRA, V. D. C.; RUBIO, F. G.; ALMEIDA, M. T. G.; NOGUEIRA, M. C. L.; PIGNATARI, A. C. C. Trends of 9,416 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 61, n. 3, p. 244–249, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302015000300244&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43 Spec No, n. February, p. 93–100, 2005.

PALLERONI, N. J.; BRADBURY, J. F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, n. 3, p. 606–609, 1993. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-43-3-606>>.

PEDROSA, A. P.; BRANDÃO, M. L. L.; MEDEIROS, V. de M.; ROSAS, C. de O.; BRICIO, S. M. L.; ALMEIDA, A. E. C. C. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Rev. Ambient. Água**, v. 9, n. 2, p. 313–324, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2014000200012&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.

PEI, A.; NOSSA, C. W.; CHOKSHI, P.; BLASER, M. J.; YANG, L.; ROSMARIN, D. M.; PEI, Z. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **PLoS one**, v. 4, n. 5, p. e5437, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2672173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 maio. 2016.

PEI, A. Y.; OBERDORF, W. E.; NOSSA, C. W.; AGARWAL, A.; CHOKSHI, P.; GERZ, E. A.; JIN, Z.; LEE, P.; YANG, L.; POLES, M.; BROWN, S. M.; SOTERO, S.; DESANTIS, T.; BRODIE, E.; NELSON, K.; PEI, Z. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 12, p. 3886–97, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2893482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 maio. 2016.

PINOT, C.; DEREDJIAN, A.; NAZARET, S.; BROTHIER, E.; COURNOYER, B.; SEGONDS, C.; FAVRE-BONTÉ, S. Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1185–93, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21819497>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

PLANZER, S. B.; DA CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S.; SILVA, R.; MOURA, M. R. L.; DE CARVALHO, L. M. J. Food safety knowledge of cheese consumers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 28–30, 2009.

POHL, S.; KLOCKGETHER, J.; ECKWEILER, D.; KHALEDI, A.; SCHNIEDERJANS, M.; CHOUVARINE, P.; TÜMMLER, B.; HÄUSSLER, S. The extensive set of accessory *Pseudomonas aeruginosa* genomic components. **FEMS Microbiology**

Letters, v. 356, n. 2, p. 235–241, 2014.

QUIGLEY, L.; MCCARTHY, R.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P.; STANTON, C.; COTTER, P. D. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 8, p. 4928–37, 2013a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746589>>.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. **The complex microbiota of raw milk** **FEMS Microbiology Reviews**, 2013b. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/37/5/664.long>>.

QURESHI, A.; MOONEY, L.; DENTON, M.; KERR, K. G. *Stenotrophomonas maltophilia* in Salad. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 7, p. 1157–1158, 2005. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/7/pdfs/04-0130.pdf>>.

RATTANAUMPAWAN, P.; USSAVASODHI, P.; KIRATISIN, P.; ASWAPOKEE, N. Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 167, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

RICARDO, N. R.; KATSUDA, M. S.; MAIA, L. F.; ABRANTES, L. F.; OSHIRO, L. M. Análise físico-química de queijos minas frescal artesanais e industrializados comercializados em Londrina-PR. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 2, p. 89–95, 2011.

RIO DE JANEIRO. Decreto Estadual nº 6.538, de 17 de fevereiro de 1983. **Diário Oficial do Município do Rio de Janeiro**, Poder Executivo, Rio de Janeiro, RJ, 18 de fevereiro de 1983. Disponível em: <<http://www.crn4.org.br/cms/upl/arqs/decreto-estadual-6538-de-1983.PDF>>. Acesso em: 01 de maio de 2016.

RIO DE JANEIRO. Decreto Municipal nº 6.235, de 30 de outubro de 1986. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, Poder Executivo, Rio de Janeiro, RJ, 13 de novembro de 1986. Disponível em: <<http://www.crn4.org.br/cms/upl/arqs/decreto-estadual-6538-de-1983.PDF>>. Acesso em: 01 de maio de 2016.

ROGUES, A. M.; MAUGEIN, J.; ALLERY, A.; FLEUREAU, C.; BOULESTREAU, H.; SURCIN, S.; BEBEAR, C.; JANVIER, G.; GACHIE, J. P. Electronic ventilator temperature sensors as a potential source of respiratory tract colonization with *Stenotrophomonas maltophilia*. **The Journal of hospital infection**, v. 49, n. 4, p. 289–92, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670101910990>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

ROSCETTO, E.; VITIELLO, L.; MUOIO, R.; SORIANO, A. a.; IULA, V. D.; VOLLARO, A.; GREGORIO, E. De; CATANIA, M. R. In vitro interaction of *Stenotrophomonas maltophilia* with human monocyte-derived dendritic cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. July, p. 1–7, 2015. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00723/abstract>>.

ROSSI, F.; RIZZOTTI, L.; FELIS, G. E.; TORRIANI, S. Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. **Food Microbiology**, v. 42, p. 232–243, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.004>>.

RYAN, R. P.; FOUHY, Y.; GARCIA, B. F.; WATT, S. A.; NIEHAUS, K.; YANG, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; DOW, J. M. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 1, p. 75–86, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18312265>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

SACCHETTI, R.; DE LUCA, G.; DORMI, a.; GUBERTI, E.; ZANETTI, F. Microbial quality of drinking water from microfiltered water dispensers. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 217, n. 2-3, p. 255–259, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.06.002>>.

SAKHNINI, E.; WEISSMANN, A.; OREN, I. Fulminant *Stenotrophomonas maltophilia* soft tissue infection in immunocompromised patients: an outbreak transmitted via tap water. **The American journal of the medical sciences**, v. 323, n. 5, p. 269, 2002. Disponível em: <http://journals.lww.com/amjmedsci/Abstract/2002/05000/Fulminant_Stenotrophomonas_maltophilia_Soft_Tissue.8.aspx>.

SÁNCHEZ, M. B. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. June, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00658/abstract>>.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262–269, 2009.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos minas frescal e ricota. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38–46, 2010. Disponível em: <<http://ses.sp.homolog.bvs.br/lildbi/docsonline/get.php?id=1750>>.

SCHWERING, M.; SONG, J.; LOUIE, M.; TURNER, R. J.; CERI, H. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. **Biofouling**, v. 29, n. 8, p. 917–28, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23879183>>.

SENAR (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural). **Queijos: produção de derivados do leite**. 2ª ed. Brasília: SENAR, 100p., 2010. Coleção SENAR; 137. Disponível em: <http://ead.senar.org.br/cartilhas/137_Queijos.pdf>. Acesso em 29 de setembro de 2014.

SETLHARE, G. G.; MALEBO, N. J.; SHALE, K.; LUES, J. F. R. Microbial levels on the food preparation areas of a typical district hospital in South Africa. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 24, p. 2998–3008, 2013. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/F61C52914016>>.

SHORT, F. L.; MURDOCH, S. L.; RYAN, R. P. Polybacterial human disease: the ills of social networking. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 9, p. 508–16, set. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X14001164>>. Acesso em: 22 mar. 2016.

SILBAQ, F. S. Viable ultramicrocells in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 106–117, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03981.x>>.

SILVA, D. S. P.; CANATO, T.; MAGNANI, M.; ALVES, J.; HIROOKA, E. Y.; DE OLIVEIRA, T. C. R. M. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella enteritidis* in food. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 7, p. 1502–1507, 2011a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2011.02646.x>>.

SILVA, M. L. T.; VASCONCELOS, M. I. L.; DIAS, M. C. G.; COSTA, G. C.; MORAES, P. **Projeto diretrizes - terapia nutricional no transplante de célula hematopoiética**. [s.l: s.n.]

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 174–183, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200610224>>.

SOMERVILLE, E. T. Special diets for neutropenic patients: Do they make a difference? **Seminars in Oncology Nursing**, v. 2, n. 1, p. 55–58, 1986. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0749-2081\(86\)90009-4](http://dx.doi.org/10.1016/0749-2081(86)90009-4)>.

SONBOL, M. B.; FIRWANA, B.; DIAB, M.; ZARZOUR, A.; WITZIG, T. E. The Effect of a Neutropenic Diet on Infection and Mortality Rates in Cancer Patients: A Meta-Analysis. **Nutrition and cancer**, p. 1–9, 23 set. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01635581.2015.1082109>>. Acesso em: 23 out. 2015.

SOUSA, C. L.; FARIA, C. P.; NEVES, E. C. A. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE BALCÕES E CÂMARAS FRIAS DE ARMAZENAMENTO DE QUEIJOS E EMBUTIDOS EM SUPERMERCADOS DA CIDADE DE BELÉM - PA (BRASIL). **B. CEPPA**, v. 21, n. 1, p. 181–192, 2003. Disponível em: <AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE BALCÕES E CÂMARAS FRIAS DE ARMAZENAMENTO DE QUEIJOS E EMBUTIDOS EM SUPERMERCADOS DA CIDADE DE BELÉM - PA (BRASIL)>.

SOUZA, P. A.; SANTOS, D. A. Microbiological risk factors associated with food handlers in elementary schools from Brazil. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 3, p.

424–429, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2009.00166.x/full>>.

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2074–9, maio 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=404678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

TODARO, M.; FRANCESCA, N.; REALE, S.; MOSCHETTI, G.; VITALE, F.; SETTANNI, L. Effect of different salting technologies on the chemical and microbiological characteristics of PDO Pecorino Siciliano cheese. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 6, p. 931–940, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1593-7>>.

TRIFILIO, S.; HELENOWSKI, I.; GIEL, M.; GOBEL, B.; PI, J.; GREENBERG, D.; MEHTA, J. Questioning the Role of a Neutropenic Diet following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 18, n. 9, p. 1385–1390, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.02.015>>.

TSUJI, A.; KANEKO, Y.; TAKAHASHI, K.; OGAWA, M.; GOTO, S. The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. **Microbiology and immunology**, v. 26, n. 1, p. 15–24, 1982. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x/abstract>>.

TWOMEY, K. B.; O'CONNELL, O. J.; MCCARTHY, Y.; DOW, J. M.; O'TOOLE, G. A.; PLANT, B. J.; RYAN, R. P. Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. **The ISME journal**, v. 6, n. 5, p. 939–50, maio 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.167>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 78–82, 1 jan. 1999. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/181/1/78.abstract>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

V. WINTZINGERODE, F.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 213–229, 1 nov. 1997. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

VAN DALEN, E. C.; MANK, A.; LECLERCQ, E.; MULDER, R. L.; DAVIES, M.; KERSTEN, M. J.; VAN DE WETERING, M. D. Low bacterial diet versus control diet to prevent infection in cancer patients treated with chemotherapy causing episodes of neutropenia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, p. Art. No.: CD006247, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006247.pub2/full>>. Acesso

em: 28 abr. 2015.

VAN TIEL, F. H.; HARBERS, M. M.; TERPORTEN, P. H. W.; VAN BOXTEL, R. T. C.; KESSELS, a. G.; VOSS, G. B. W. E.; SCHOUTEN, H. C. Normal hospital and low-bacterial diet in patients with cytopenia after intensive chemotherapy for hematological malignancy: A study of safety. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1080–1084, 2007.

VENIER, A.-G.; LEROYER, C.; SLEKOVEC, C.; TALON, D.; BERTRAND, X.; PARER, S.; ALFANDARI, S.; GUERIN, J.-M.; MEGARBANE, B.; LAWRENCE, C.; CLAIR, B.; LEPAPE, A.; PERRAUD, M.; CASSIER, P.; TRIVIER, D.; BOYER, A.; DUBOIS, V.; ASSELINEAU, J.; ROGUES, A.-M.; THIÉBAUT, R. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. **Journal of Hospital Infection**, v. 88, n. 2, p. 103–108, 16 ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2014.06.018>>.

VERWEIJ, P. E.; MEIS, J. F. G. M.; CHRISTMANN, V.; VAN DER BOR, M.; MELCHERS, W. J. G.; HILDERINK, B. G. M.; VOSS, A. Nosocomial outbreak of colonization and infection with *Stenotrophomonas maltophilia* in preterm infants associated with contaminated tap water. **Epidemiol. Infect.**, v. 120, n. 3, p. 251–256, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809402/>>.

VICENSKI, P. P.; ALBERTI, P.; AMARAL, D. J. C. Dietary recommendations for immunosuppressed patients of 17 hematopoietic stem cell transplantation centers in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 2, p. 86–93, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842012000200008&nrm=iso>.

VIEIRA, C. D.; DE CARVALHO, M. A. R.; CUSSIOL, N. A. de M.; ALVAREZ-LEITE, M. E.; DOS SANTOS, S. G.; GOMES, R. M. da F.; SILVA, M. X.; NICOLI, J. R.; FARIAS, L. de M. Count, identification and antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from dental solid waste in Brazil. **Waste Management**, v. 31, n. 6, p. 1327–32, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X11000043>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

VITHANAGE, N. R.; YEAGER, T. R.; JADHAV, S. R.; PALOMBO, E. A.; DATTA, N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 26–38, 17 out. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514003663>>. Acesso em: 16 maio. 2016.

VONBERG, R. P.; WOLTER, A.; CHABERNY, I. F.; KOLA, A.; ZIESING, S.; SUERBAUM, S.; GASTMEIER, P. Epidemiology of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: Data from an university hospital over a 36-month period. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, n. 3-4, p. 251–257, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463907001320>>.

WANG, J.-L.; CHEN, M.-L.; LIN, Y. E.; CHANG, S.-C.; CHEN, Y.-C. Association between Contaminated Faucets and Colonization or Infection by Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Intensive Care Units in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3226–3230, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/47/10/3226.abstract>>.

WEBER, D. J.; RUTALA, W. A.; BLANCHET, C. N.; JORDAN, M.; GERGEN, M. F. Faucet aerators: A source of patient colonization with *Stenotrophomonas maltophilia*. **American Journal of Infection Control**, v. 27, n. 1, p. 59–63, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655399700775>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

WELSH, M. A.; BLACKWELL, H. E. Chemical Genetics Reveals Environment-Specific Roles for Quorum Sensing Circuits in *Pseudomonas aeruginosa*. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 3, p. 361–369, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2451945616300071>>.

WHITBY, P. W.; CARTER, K. B.; BURNS, J. L.; ROYALL, J. A.; LIPUMA, J. J.; STULL, T. L. Identification and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-directed PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4305–9, dez. 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=87596&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. Acesso em: 6 abr. 2016.

WHITE, A. S.; GODARD, R. D.; BELLING, C.; KASZA, V.; BEACH, R. L. Beverages obtained from soda fountain machines in the U.S. contain microorganisms, including coliform bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 137, n. 1, p. 61–6, 31 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509005923>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

WILKINSON, F. H.; KERR, K. G. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. **European journal of cancer care**, v. 7, n. 1, p. 12–14, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2354.1998.00059.x/abstract>>.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases. **Respirology**, v. 15, n. 7, p. 1037–1056, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x/full>>.

WOLUPECK, H. L.; RAKSA, H. C.; ROSSA, L. S.; BIASI, R.; MACEDO, R. E. F. Evolução da qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado em Curitiba (PR) no intervalo de 10 anos (1999 e 2009). **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 10, n. 3, p. 243–252, 2012. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/academica?dd99=pdf&dd1=7707>>.

WONG, M. H.; CHAN, E. W. chi; CHEN, S. Isolation of carbapenem-resistant *Pseudomonas* spp. from food. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 109–114, jun. 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221371651500034X>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

WRIGHT, C.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 453–454, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC169798/>>.

WU, K.; YAU, Y. C. W.; MATUKAS, L.; WATERS, V. Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from cystic fibrosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1546–8, 1 mar. 2013. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/57/3/1546.full>>. Acesso em: 6 abr. 2016.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 18 jan. 2012. Disponível em: <<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-13-134>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

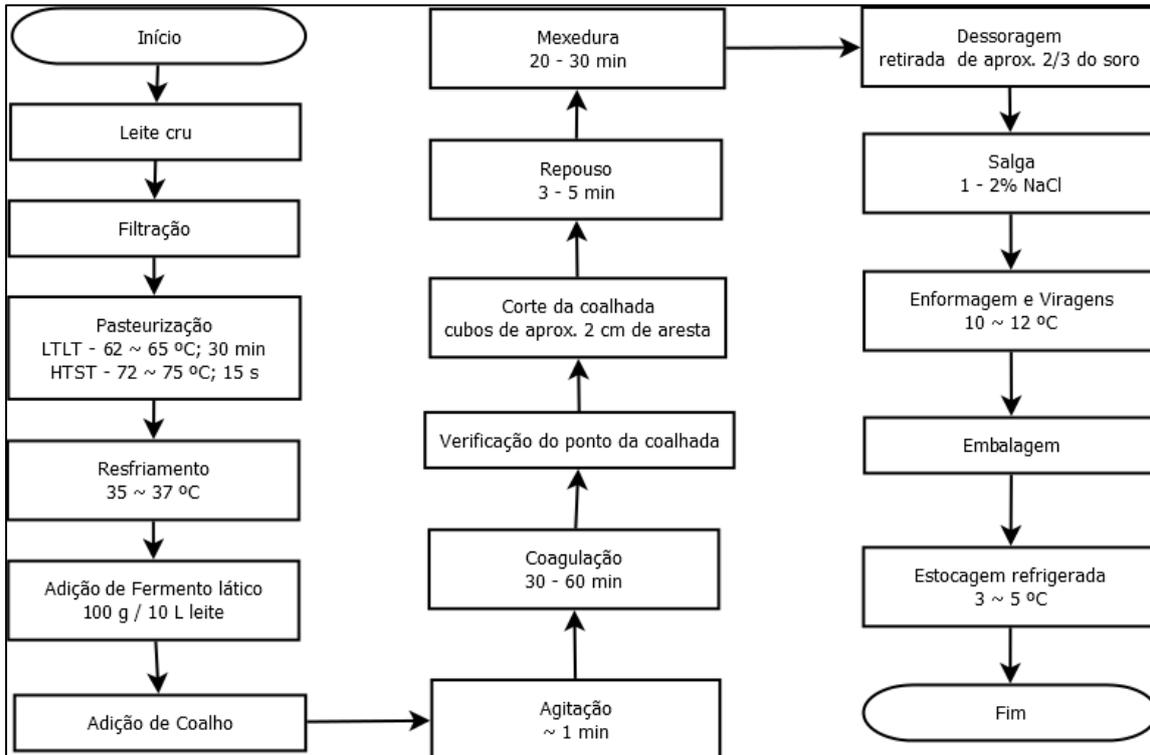
ZABORINA, O.; KOHLER, J. E.; WANG, Y.; BETHEL, C.; SHEVCHENKO, O.; WU, L.; TURNER, J. R.; ALVERDY, J. C. Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 14, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ann-clinmicrob.com/content/5/1/14>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

ZHUO, C.; ZHAO, Q.; XIAO, S. The impact of spgM, rpfF, rmlA gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108409, 10 jan. 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108409>>. Acesso em: 6 abr. 2016.

ZONTA, G.; SOUZA, D. C.; COSTA, M. R.; BONESI, G.; COSTA, R. G.; ALEGRO, L. C. A.; SANTANA, E. H. W. Qualidade Microbiológica de Produtos Cárneos e Lácteos Comercializados em Feiras Livres de Arapongas-PR. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. ESP, p. 377–384, 2013. Disponível em: <<http://revista.unopar.br/biologicaesaude/revistaBiologicas/getArtigo?codigo=00001442>>.

APÊNDICE A – Fluxograma de Produção de Queijo Minas Frescal

Figura 7: Fluxograma de Produção de Queijo Minas Frescal



Fonte: Adaptado de SENAR (2010)

APÊNDICE B – Quadro comparativo entre a RDC ANVISA nº 12/2001 e a Portaria MAPA nº 146/1996

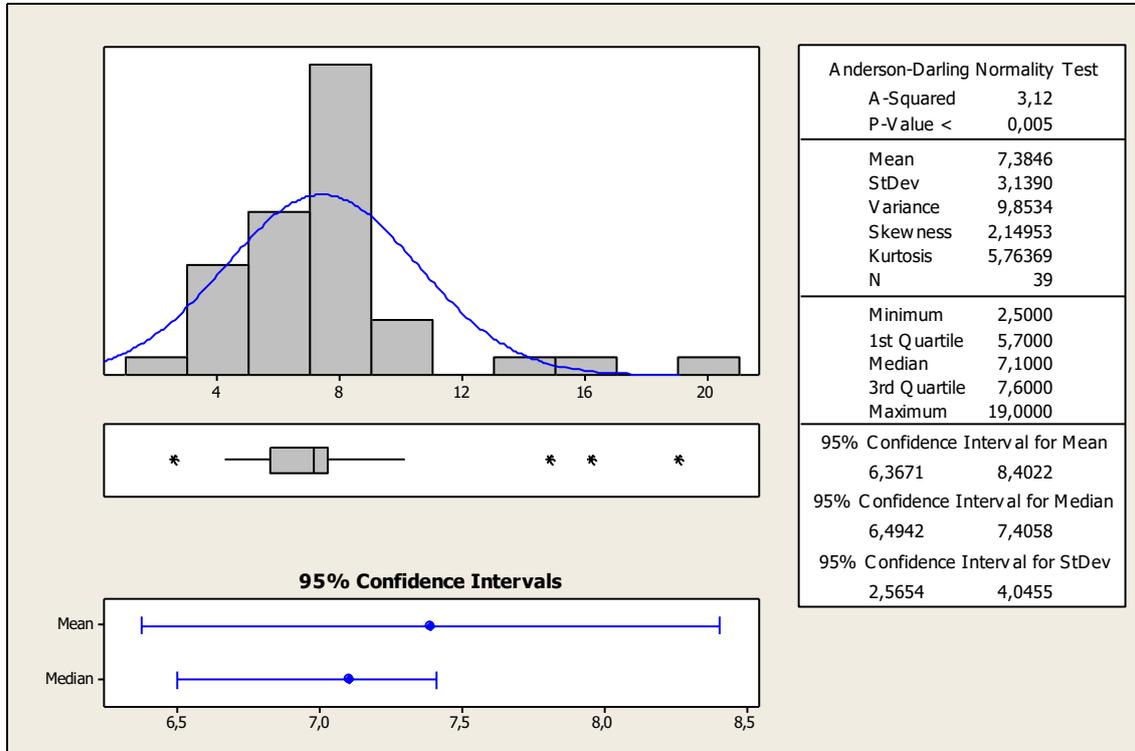
Quadro 2: Quadro comparativo entre a RDC ANVISA nº 12/2001 e a Portaria MAPA nº 146/1996

	Grupo de Alimentos	Microrganismo	Tolerância para Amostra Indicativa	Tolerância para Amostra Representativa				
				N	c	m	M	
RDC nº 12/2001 – ANVISA	Queijos de alta umidade: >46% Queijos de muito alta umidade: >55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluído o Minas frescal correspondente	Coliformes a 45°C/g	5x10 ³	5	2	10 ³	5x10 ³	
		Estaf. coag. positiva/g	10 ³	5	2	10 ²	10 ³	
		<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus	5	0	Aus	-	
		<i>L. monocytogenes</i> /25 g	Aus	5	0	Aus	-	
	Queijos de muito alta umidade: >55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, minas frescal, muçarela e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas	Coliformes a 45 °C/g	5x10 ²	5	2	5x10	5x10 ²	
		Estaf. coag. positiva/g	5x10 ²	5	1	10 ²	5x10 ²	
		<i>Salmonella sp</i> /25 g	Aus	5	0	Aus	-	
		<i>L. monocytogenes</i> /25 g	Aus	5	0	Aus	-	
	Portaria nº 352/1997 – MAPA	Queijo de muito alta umidade com bactérias lácticas em forma viável e abundantes (Umidade > 55%)	Coliforme/g (30 °C)	-	5	3	10 ²	10 ³
			Coliforme/g (45 °C)	-	5	2	10	10 ²
Estaf. coag. positiva/g			-	5	2	10	10 ²	
Fungos e Leveduras/g			-	5	2	5x10 ²	5x10 ³	
<i>Salmonella sp</i> /25 g			-	5	0	0	-	
<i>L. monocytogenes</i> /25 g			-	5	0	0	-	
Coliforme/g (30 °C)			-	5	2	10 ²	10 ³	
Queijo de muito alta umidade sem bactérias lácticas em forma viável e abundantes (umidade > 55%)		Coliforme/g (45 °C)	-	5	2	5x10	5x10 ²	
		Estaf. coag. positiva/g	-	5	1	10 ²	5x10 ²	
		Fungos e Leveduras/g	-	5	2	5x10 ²	5x10 ³	
		<i>Salmonella sp</i> /25 g	-	5	0	0	-	
		<i>L. monocytogenes</i> /25 g	-	5	0	0	-	

Fonte: Adaptado de Brasil (1996, 2001)

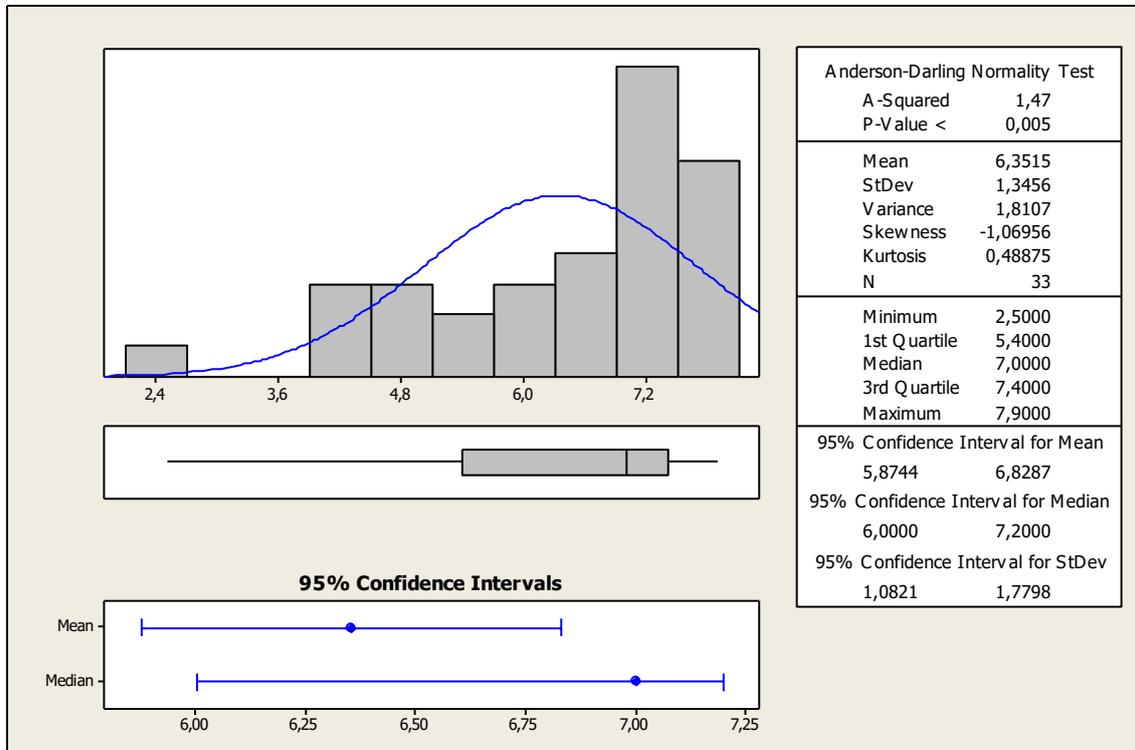
APÊNDICE C – Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização dos produtos (n=39)

Figura 8: Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização dos produtos (n=39)



APÊNDICE D – Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização das amostras (n=33)

Figura 9: Sumário gráfico da variável temperatura de comercialização das amostras (n=33)



APÊNDICE E – Verificação de especificidade de pares de primer de Gallo et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Quadro 3: Verificação de especificidade de pares de primer de Gallo et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento	Tamanho (pb)	Trocas de bases
CP008838.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 13637 genome	F: 3960671 – 3960694 R: 3960948 – 3960931	278	-
		F: 3516819 – 3516796 R: 3516542 – 3516559	278	-
AM743169.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a complete genome, strain K279a	F: 424409 – 424432 R: 424686 - 424669	278	-
		F: 418745 - 418768 R: 419022 - 419005	278	-
		F: 4790313 - 4790290 R: 4790036 – 4790053	278	-
		F: 4784649 – 784626 R: 4784372 - 784389	278	-
AF273255.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 269 – 292 R: 546 – 529	278	-
CP011305.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS2, complete genome	F: 346855 – 346878 R: 347132 – 347115	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4446171 – 4446148 R: 4445894 – 4445911	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
CP011306.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS2R, complete genome	F: 346855 – 346878 R: 347132 – 347115	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4446171 – 4446148 R: 4445894 - 4445911	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
CP011010.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS3, complete genome	F: 4745167 – 4745144 R: 4744890 – 4744907	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4739500 – 4739477 R: 4739223 – 4739240	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 375689 – 375712 R: 375966 – 375949	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
LM523569.1	<i>Parastrongyloides trichosuri</i> genome assembly P_trichosuri_KNP, scaffold PTRK_scaffold0000215	F: 3404 – 3381 R: 3127 – 3144	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
LK911072.1	<i>Brugia timori</i> genome assembly B_timori_Indonesia_v1_0_4, scaffold BTMF_scaffold0005901	F: 294 – 317 R: 571 – 554	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC
HE798556.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457 complete genome	F: 4706918 – 4706895 R: 4706641 – 4706658	278	F: GCTG A TTTGGTTC TAGGAAAACGC

(continua)

(conclusão)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento	Tamanho (pb)	Trocas de bases
CP002986.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> JV3, complete genome	F: 373947 – 373970 R: 374224 – 374207	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 368283 – 368306 R: 368560 – 368543	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4483702 – 4483679 R: 4483425 – 4483442	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4478038 – 4478015 R: 4477761 – 4477778	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
HQ616676.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 06a 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 196 – 219 R: 473 – 456	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
CP001111.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3, complete genome	F: 4510682 – 4510659 R: 4510405 – 4510422	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 4505012 – 4504989 R: 4504735 – 4504752	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
		F: 361013 – 361036 R: 361290 - 361273	278	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC
AF175764.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AU789 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 269 – 292 R: 550 - 533	282	F: GCTG <u>A</u> TTTGGTTC TAGGAAAACGC

APÊNDICE F – Verificação de especificidade de pares de *primer* de Whitby et al. (2000) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Quadro 4: Verificação de especificidade de pares de primer de Whitby et al. (2000) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento	Tamanho (pb)	Trocas de bases
CP014274.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. KCTC 12332, complete genome	F: 4269760 – 4269775 R: 4270289 – 4270271	530	-
		F: 4264070 – 4264085 R: 4264599 – 4264581	530	-
		F: 4258382 – 4258397 R: 4258911 – 4258893	530	-
		F: 1850314 – 1850299 R: 1849785 – 1849803	530	-
CP011131.1	<i>Lysobacter gummosus</i> strain 3.2.11, complete genome	F: 1026153 – 1026168 R: 1026682 – 1026664	530	-
		F: 514038 – 514053 R: 514567 - 514549	530	-
CP012900.1	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> strain ZAC14D2_NAIMI4_2, complete genome	F: 661750 – 661765 R: 662279 – 662261	530	-
		F: 406576 – 406591 R: 407105 – 407087	530	-
		F: 58019 – 58034 R: 58548 – 58530	530	-
CP011305.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS2, complete genome	F: 346648 – 346663 R: 347179 – 347161	532	-
		F: 340983 - 340998 R: 341514 – 341496	532	-
		F: 4446378 – 4446363 R: 4445847 – 4445865	532	-
		F: 4440715 – 4440700 R: 4440184 – 4440202	532	-
CP011306.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS2R, complete genome	F: 346648 – 346663 R: 347179 – 347161	532	-
		F: 340983 - 340998 R: 341514 – 341496	532	-
		F: 4446378 – 4446363 R: 4445847 – 4445865	532	-
		F: 4440715 – 4440700 R: 4440184 – 4440202	532	-
CP011010.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain ISMMS3, complete genome	F: 375482 – 375497 R: 376013 – 375995	532	-
		F: 369815 – 369830 R: 370346 – 370328	532	-
		F: 4745374 – 4745359 R: 4744843 – 4744861	532	-
		F: 4739707 – 4739692 R: 4739176 – 4739194	532	-
LM523569.1	<i>Parastrongyloides trichosuri</i> genome assembly P_trichosuri_KNP, scaffold PTRK_scaffold0000215	F: 3611 – 3596 R: 3080 – 3098	532	-
LL974006.1	<i>Schistosoma rodhaini</i> genome assembly S_rodhaini_Burundi, scaffold SROB_scaffold0016780	F: 2384 – 2399 R: 2830 – 2812	447	-

(continua)

(continuação)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região alinhamento de	Tamanho (pb)	Trocas de bases
LK911072.1	<i>Brugia timori</i> genome assembly B_timori_Indonesia_v1_0_4, scaffold BTMF_scaffold0005901	F: 87 – 102 R: 618 – 600	532	-
CP008838.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain 13637 genome	F: 3960464 – 3960479 R: 3960995 – 3960977	532	-
		F: 3517026 – 3517011 R: 3516495 – 3516513	532	-
NR_122022.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain e-p10 23S ribosomal RNA, complete sequence	F: 69 – 84 R: 598 – 580	530	-
CP007597.1	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain DSM14405 genome	F: 4645855 – 4645870 R: 4646384 – 4646366	530	-
		F: 4640114 – 4640129 R: 4640643 – 4640625	530	-
		F: 4111760 – 4111745 R: 4111231 – 4111249	530	-
NR_076925.1	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	F: 62 – 77 R: 593 – 575	532	-
NR_076594.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain R551-3 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	F: 62 – 77 R: 593 – 575	532	-
HE798556.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457 complete genome	F: 403161 – 403176 R: 403692 – 403674	532	-
		F: 397501 – 397516 R: 398032 – 398014	532	-
		F: 4707125 – 4707110 R: 4706594 – 4706612	532	-
		F: 4701465 – 4701450 R: 4700934 – 4700952	532	-
CP003093.2	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> BD-a59, complete genome	F: 3413893 – 3413878 R: 3413362 – 3413380	532	-
CP002986.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> JV3, complete genome	F: 373740 – 373755 R: 374271 – 374253	532	-
		F: 368076 – 368091 R: 368607 – 368589	532	-
		F: 4483909 – 4483894 R: 4483378 – 4483396	532	-
		F: 4478245 – 4478230 R: 4477714 – 4477732	532	-
CP001111.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3, complete genome	F: 4510889 – 4510874 R: 4510358 – 4510376	532	-
		F: 4505219 – 4505204 R: 4504688 – 4504706	532	-
		F: 360806 – 360821 R: 361337 – 361319	532	-
		F: 355136 – 355151 R: 355667 – 355649	532	-

(continuação)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região alinhamento	de	Tamanho (pb)	Trocas de bases
AM743169.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a complete genome, strain K279a	F: 424202 – 424217		532	-
		R: 424733 - 424715			
		F: 418538 – 418553		532	-
		R: 419069 – 419051			
		F: 4790520 – 4790505		532	-
		R: 4789989 – 4790007			
		F: 4784856 – 4784841		532	-
		R: 4784325 - 4784343			
AF273255.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 62 – 77		532	-
		R: 593 – 575			
AF175765.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain PC760 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 62 – 77		533	-
		R: 594 - 576			
AF175764.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AU789 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 62 – 77		536	-
		R: 597 – 579			
AF175763.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AU680 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 62 – 77		529	-
		R: 590 – 572			
KT865836.1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. ALBL_145 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 14 – 29		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 543 – 525			
KT865835.1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. ALBL_143 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 15 – 30		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 544 – 526			
KT865775.1	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. ALBL_017 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	F: 17 – 32		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 546 – 528			
CP008714.1	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. undulosa strain Xtu 4699, complete genome	F: 441659 – 441674		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 442188 – 442170			
		F: 170099 – 170114		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 170628 – 170610			
CP010409.1	<i>Xanthomonas sacchari</i> strain R1, complete genome	F: 3657687 – 3657702		527	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 3658213 – 3658195			
		F: 3224298 – 3224313		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 3224827 – 3224809			
NR_077037.1	<i>Xanthomonas albilineans</i> strain GPE PC73 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	F: 62 – 77		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 591 – 573			
FP565176.1	<i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73 complete genome	F: 436291 – 436306		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 436820 – 436802			
		F: 3692450 – 3692435		530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG
		R: 3691921 – 3691939			
NR_076961.1	<i>Frateuria aurantia</i> strain G-6 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	F: 59 – 74		531	R: TTAAGCTTGCCAC AGACAG
		R: 589 - 571			

(conclusão)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região alinhamento de	Tamanho (pb)	Trocas de bases
CP003350.1	<i>Frateuria aurantia</i> DSM 6220, complete genome	F: 576518 – 576533 R: 577048 – 577030	531	R: TTAAGCTTGCCAC AGACAG
		F: 54827 – 54842 R: 55357 – 55339	531	R: TTAAGCTTGCCAC AGACAG
		F: 46195 – 46210 R: 46725 – 46707	531	R: TTAAGCTTGCCAC AGACAG
		F: 2974664 – 2974649 R: 2974134 – 2974152	531	R: TTAAGCTTGCCAC AGACAG
CP007444.1	<i>Dyella jiangningensis</i> strain SBZ 3-12, complete genome	F: 4958101 – 4958116 R: 4958630 – 4958612	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
		F: 4554791 – 4554806 R: 4555320 – 4555302	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
CP008884.1	<i>Dyella japonica</i> A8, complete genome	F: 4828812 – 4828797 R: 4828283 – 4828301	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
		F: 672876 – 672861 R: 672347 – 672365	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
NR_102579.1	<i>Rhodanobacter denitrificans</i> strain 2APBS1 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	F: 59 – 74 R: 588 – 570	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
CP003470.1	<i>Rhodanobacter denitrificans</i> strain 2APBS1, complete genome	F: 436964 – 436979 R: 437493 – 437475	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG
		F: 4088370 – 4088355 R: 4087841 – 4087859	530	F: CAGCCTGCGAAAA GTG R: TTAAGCTTGCCAC TGACAG

APÊNDICE G – Verificação de especificidade de pares de *primer* de Choi et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Quadro 5: Verificação de especificidade de pares de primer de Choi et al. (2013) - Primer-BLAST – 31/03/2016

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento
CP008873.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F9670, complete genome	F: 1752442 – 1752419 R: 1752211 – 1752230
CP008872.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain X78812, complete genome	F: 6253896 – 6253919 R: 6254127 – 6254108
CP013993.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DHS01, complete genome	F: 6686786 – 6686809 R: 6687017 – 6686998
CP013989.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain USDA-ARS-USMARC-41639, complete genome	F: 6020919 – 6020942 R: 6021150 – 6021131
CP008871.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain W45909, complete genome	F: 6323770 – 6323747 R: 6323539 – 6323558
CP008870.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain W36662, complete genome	F: 5742345 – 5742368 R: 5742576 – 5742557
CP008869.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain W16407, complete genome	F: 6540403 – 6540380 R: 6540172 – 6540191
CP008868.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain T63266, complete genome	F: 1277511 – 1277534 R: 1277742 – 1277723
CP008867.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain T52373, complete genome	F: 2119534 – 2119557 R: 2119765 – 2119746
CP008866.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain T38079, complete genome	F: 3850785 – 3850762 R: 3850554 – 3850573
CP008865.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S86968, complete genome	F: 2358095 – 2358118 R: 2358326 – 2358307
CP008863.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain M37351, complete genome	F: 3183401 – 3183424 R: 3183632 – 3183613
CP008864.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain W60856, complete genome	F: 5173567 – 5173590 R: 5173798 – 5173779
CP008862.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain M1608, complete genome	F: 4767486 – 4767463 R: 4767255 – 4767274
CP008861.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain H47921, complete genome	F: 4235588 – 4235565 R: 4235357 – 4235376
CP008860.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain H27930, complete genome	F: 846944 – 846967 R: 847175 – 847156
CP008859.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain H5708, complete genome	F: 1136466 – 1136443 R: 1136235 – 1136254
CP008858.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F63912, complete genome	F: 5698145 – 5698122 R: 5697914 – 5697933
CP008857.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F30658, complete genome	F: 4259894 – 4259917 R: 4260125 – 4260106
CP008856.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F23197, complete genome	F: 3222362 – 3222339 R: 3222131 – 3222150
CP012901.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain N15-01092, complete sequence	F: 370897 – 370874 R: 370666 – 370685
CP013696.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain 12-4-4(59), complete genome	F: 1133709 – 1133732 R: 1133940 – 1133921
CP013680.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AES-1R, complete genome	F: 1463000 – 1463023 R: 1463231 – 1463212
CP013144.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Cu1510, complete genome	F: 4684415 – 4684392 R: 4684184 – 4684203
AP017302.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA, complete genome, strain: IOMTU 133	F: 6506948 – 6506971 R: 6507179 – 6507160
CP013245.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain VA-134, complete genome	F: 2588617 – 2588594 R: 2588386 – 2588405

(continua)

(continuação)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento
LN870292.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK1 genome assembly <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK1 substr. NH57388A, chromosome : I	F: 5843674 – 5843697 R: 5843905 – 5843886
CP012679.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PA1RG, complete genome	F: 6124639 – 6124662 R: 6124870 – 6124851
CP004054.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1, complete genome	F: 6122273 – 6122296 R: 6122504 – 6122485
LN871187.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> genome assembly PAO1OR, chromosome : I	F: 5908949 – 5908972 R: 5909180 – 5909161
AP014839.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA, complete genome, strain: 8380	F: 6244406 – 6244429 R: 6244637 – 6244618
CP012066.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F9676, complete genome	F: 6306855 – 6306832 R: 6306624 – 6306643
CP012001.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071, complete genome	F: 5948137 – 5948160 R: 5948368 – 5948349
CP011369.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S04 90 genome	F: 6733032 – 6733055 R: 6733263 – 6733244
CP011317.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain Carb01 63, complete genome	F: 7054341 – 7054364 R: 7054572 – 7054553
LN831024.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> genome assembly NCTC10332, chromosome : 1	F: 5947591 – 5947614 R: 5947822 – 5947803
AP014651.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA, complete genome, strain: NCGM257	F: 6691730 – 6691753 R: 6691961 – 6691942
CP010555.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain FRD1, complete genome	F: 4669704 – 4669681 R: 4669473 – 4669492
CP007399.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain F22031, complete genome	F: 2164565 – 2164588 R: 2164796 – 2164777
AP014646.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA, complete genome, strain: NCGM 1984	F: 6418843 – 6418866 R: 6419074 – 6419055
HG974234.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PSE305, genome	F: 5495192 – 5495215 R: 5495423 – 5495404
CP008739.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VRFP04, complete genome	F: 6450566 – 6450589 R: 6450797 – 6450778
AP014622.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA, complete genome, strain: NCGM 1900	F: 6382826 – 6382849 R: 6383057 – 6383038
CP008749.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1H2O genome	F: 5896884 – 5896907 R: 5897115 – 5897096
CP007224.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA96 genome	F: 6068360 – 6068383 R: 6068591 – 6068572
CP006985.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESlike4 sequence	F: 6155109 – 6155132 R: 6155340 – 6155321
CP006984.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESlike1 sequence	F: 6140140 – 6140163 R: 6140371 – 6140352
CP006983.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB65 sequence	F: 6158059 – 6158082 R: 6158290 – 6158271
CP006982.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LES400 sequence	F: 6222385 – 6222408 R: 6222616 – 6222597
CP006981.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESlike7 sequence	F: 6098968 – 6098991 R: 6099199 – 6099180
CP006980.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESlike5 sequence	F: 6174404 – 6174427 R: 6174635 – 6174616
CP007147.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> YL84, complete genome	F: 1206105 – 1206082 R: 1205874 – 1205893
HG530068.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA38182, complete genome	F: 6085195 – 6085218 R: 6085426 – 6085407
CP006931.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SCV20265, complete genome	F: 6348619 – 6348642 R: 6348850 – 6348831
CP006937.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LES431, complete genome	F: 6181125 – 6181148 R: 6181356 – 6181337

(conclusão)

Cód. acesso GeneBank	Descrição	Região de alinhamento
CP006853.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTB-1, complete genome	F: 6212544 – 6212567 R: 6212775 – 6212756
CP004055.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1R, complete genome	F: 3543624 – 3543647 R: 3543855 – 3543836
CP006832.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1-VE13 genome	F: 5896879 – 5896902 R: 5897110 – 5897091
CP006831.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1-VE2 genome	F: 5897964 – 5897987 R: 5898195 – 5898176
CP006705.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO581 genome	F: 5676465 – 5676488 R: 5676696 – 5676677
CP006728.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> c7447m genome	F: 5894686 – 5894709 R: 5894917 – 5894898
CP006245.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RP73, complete genome	F: 5973318 – 5973341 R: 5973549 – 5973530
CP004061.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B136-33, complete genome	F: 6052772 – 6052795 R: 6053003 – 6052984
CP003149.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DK2, complete genome	F: 5996683 – 5996706 R: 5996914 – 5996895
AP012280.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCGM2.S1 DNA, complete genome	F: 6388614 – 6388637 R: 6388845 – 6388826
CP002496.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18, complete genome	F: 5951725 – 5951748 R: 5951956 – 5951937
FM209186.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LESB58 complete genome sequence	F: 6232811 – 6232834 R: 6233042 – 6233023
CP000438.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCPBP-PA14, complete genome	F: 6169097 – 6169120 R: 6169328 – 6169309
AE004091.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	F: 5896884 – 5896907 R: 5897115 - 5897096

* Todos os produtos apresentaram o tamanho esperado de 232 pb e 100% de homologia