

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Liana Jayme Borges

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS EM
MANIPULADORES E DIETAS ENTERAIS DE DOIS HOSPITAIS PÚBLICOS
DE GOIÂNIA**



Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

Goiânia-Go

2010

Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Liana Jayme Borges		
CPF:	96401695187	E-mail:	Liana_jayme@yahoo.com.br
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não			
Vínculo Empregatício do autor	Professora Substituta – FANUT/UFG		
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq
País:	Brasil	UF:	GO
CNPJ:			
Título:	Caracterização de microrganismos isolados em manipuladores e dietas enterais de dois hospitais públicos de Goiânia		
Palavras-chave:	Microbiologia de alimentos, biologia molecular, caracterização fenotípica, dietas enterais, manipulador de alimentos		
Título em outra língua:	Characterization of microorganisms isolated in enteral feedings and food works of two publics hospitals in Goiânia/Brazil		
Palavras-chave em outra língua:	food microbiology, molecular biology, phenotypic characterization, enteral feeding, food works		
Área de concentração:	Bacteriologia/ Microbiologia de alimentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	19/03/2010		
Programa de Pós-Graduação:	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG)		
Orientador(a):	Professor Doutor Álvaro Bisol Serafini		
CPF:	296458080/49	E-mail:	abserafini@gmail.com
Co-orientador(a):	Professora Doutora Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André		
CPF:	394158801/04	E-mail:	mcdantas@iptsp.ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Liana Jayme Borges

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS EM
MANIPULADORES E DIETAS ENTERAIS DE DOIS HOSPITAIS PÚBLICOS
DE GOIÂNIA**

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

**Tese submetida ao
PPGMT/IPTSP/UFG como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Medicina Tropical, área
de concentração: Microbiologia.**

Goiânia-Go

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Borges, Liana Jayme.
B732c Caracterização de microrganismos isolados em manipuladores e dietas enterais de dois hospitais públicos de Goiânia [manuscrito] / Liana Jayme Borges. - 2010.
188 f. : il , figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de abreviaturas.
Anexos.

1. Dietas enterais - Qualidade microbiológica. 2.
Alimentação enteral - Susceptibilidade antimicrobiana. 3.
Manipulador de alimentos. I.Título

CDU: 615.874:579.67(817.3)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô e padrinho Leyde Jayme, homem estimado e digno de toda consideração por sua vida honrada. Homem de caráter antigo, de sensibilidade antiga e de antiga honradez, incapaz de ceder às vãs atitudes dos desonestos, sustentou durante toda a vida a sua dignidade, pureza e bondade. Graças aos seus conselhos e exemplo venci mais uma etapa de minha vida pelo caminho do bem. Tenho certeza que, de onde estiver, traz em seu rosto o sorriso e a alegria advindos do prazer de contemplar meu dever cumprido.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida. - ninguém, exceto tu, só tu.

Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias.

Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o!”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador e amigo Álvaro Bisol Serafini, pela orientação, pela ajuda solícita e pela forma tranqüila com que juntos sempre trabalhamos.

À minha co-orientadora, amiga e companheira Maria Cláudia D. P. B. André pela orientação, cooperação, paciência, amizade e valiosos conselhos e ensinamentos.

À minha professora e amiga Maria Raquel Hidalgo Campos, pela solidariedade em todos os momentos, profissional e pessoal, pela confiança e credibilidade depositados em mim e por tornar meu caminho mais fácil e agradável.

À nutricionista Ana Tereza Vaz de Souza Freitas pelo entusiasmo e viabilização do tema do projeto de pesquisa.

Aos amigos de trabalho Lara Leão, Juliana Lamaro e Yves Mauro pela amizade, companheirismo e convivência agradável.

Aos amigos Fernando Koslowski, José Clementino da Silva e Kariny Vieira Soares, pelo profissionalismo, competência e acessibilidade.

Ao funcionário do laboratório Aristides José Barbosa, pela ajuda e disponibilidade na execução do trabalho prático.

Às nutricionistas dos hospitais que abriram as portas do Serviço de Nutrição para o desenvolvimento da pesquisa ao cederem amostras do material a ser analisado.

Aos colaboradores da Unidade de Dietas Especiais dos hospitais, pela disponibilidade em fornecer os dados necessários à pesquisa

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pelas valiosas contribuições na finalização da tese.

Aos professores do curso, colegas de trabalho, funcionários e amigos que de alguma forma colaboraram para a realização do trabalho.

Aos meus familiares e amigos... pela convivência, apoio e incentivo.

Aos meus pais, José Sizenando e Maria Helena, por me terem proporcionado um lar estruturado, fonte de meu equilíbrio e de minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Germana e Gabriel, pela compreensão, tranquilidade e alegrias que me proporcionam.

À Deus, meu amigo, por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho e a quem não me faltam motivos para agradecer.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando,

A certeza de que é preciso continuar

E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Fazer do medo uma escada,

Fazer do sonho a ponte.”

Fernando Sabino

LISTA DE ABREVIATURAS

ABERC – Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
APC – Ágar Padrão para Contagem
APHA – American Public Health Association
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AP-PCR – Arbitrary primed-Polimerase Chain Reaction
APT – Água Peptonada Tamponada
BGN – Bacilos Gram- Negativos
BHI – Brain Hearth Infusion
BM – Banho-Maria
BP – Ágar Baird -Parker
BPPNE – Boas Práticas de Produção de Nutrição Enteral
CAST – Council for Agricultural Science and Technology
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CENEPI – Centro Nacional de Epidemiologia
CERTEPE – Centro de Referência no Tratamento e Pesquisa em Epilepsia
CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica
DAEC – *Escherichia coli* Aderente-Difusa
DE – Dieta Enteral
DNA – Deoxyribonucleic acid
DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC – *E. coli* Enterogregativa
EC – Caldo *Escherichia coli*
EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva
EMB – Ágar Eosin Methylene Blue
EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica
ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica
ExPEC - *Escherichia coli* Extraintestinal
FAO – Food and Agricultural Organization

FDA – Food and Drug Administration

HC – Hospital das Clínicas

HUGO – Hospital de Urgências de Goiânia

IBRANUTRI - Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IgA – Imunoglobulina A

IMViC – Teste de Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer, Citrato

kb – kilobases

MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis

MS – Ministério da Saúde

MYP – Ágar Manitol Yolk Polimixin

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NE – Nutrição Enteral

PCR – Polimerase Chain Reaction

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

PK – Proteinase K

PT – Pulsotipos

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

REA – Restriction Enzyme Analysis

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphisms

SEs – Enterotoxinas estafilocócicas

SPS – Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina

SS – Ágar *Salmonella* – *Shigella*

ST – Subtipos

SUH – Síndrome Urêmica Hemolítica

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Serviço de Vigilância em Saúde

TAF – Tríplice Açúcar Ferro

TBE – Toxina Esfoliativa tipo B

TSB – Tryptic Soy Broth

UAN – Unidade de Alimentação e Nutrição

UDE – Unidade de Dietas Especiais

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFG – Universidade Federal de Goiás

UPEC – *Escherichia coli* Uropatogênica

UPGMA – Unweighted Pair Group Methods with Arithmetic Averages.

UV – Ultravioleta

VP – Voges Proskauer

VRBA – Violet Red Bile Agar

WHO – World Health Organization

XLD – Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

	RESUMO	14
	ABSTRACT	15
1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	HISTÓRICO	19
2.2	ALIMENTAÇÃO HOSPITALAR ESPECIAL – DIETAS ENTERAIS	20
2.3	VIGILÂNCIA SANITÁRIA E LEGISLAÇÃO ATUAL	26
2.4	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO CONTROLE DE QUALIDADE	28
2.5	MICRORGANISMOS CONTAMINANTES	30
2.5.1	Microrganismos aeróbios mesófilos	30
2.5.2	Bolores e leveduras	31
2.6	MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS GRAM-NEGATIVOS	33
2.6.1	<i>Salmonella sp</i>	33
2.6.2	<i>Escherichia coli</i>	34
2.6.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.7	MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS GRAM-POSITIVOS	38
2.7.1	<i>Staphylococcus sp</i>	38
2.7.2	<i>Bacillus cereus</i>	40
2.7.3	<i>Clostridium perfringens</i>	42
2.8	MANIPULADOR DE ALIMENTOS	43
2.9	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTAs)	45
2.10	FATORES QUE CONTRIBUEM PARA A OCORRÊNCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	50
2.11	EPIDEMIOLOGIA	53
2.12	TIPIFICAÇÃO MICROBIANA	55
3	JUSTIFICATIVA	64
4	OBJETIVOS	66
5	MATERIAL E MÉTODOS	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7	Artigo 1	105
8	Artigo 2	123

9	RECOMENDAÇÕES	151
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	152
	ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-HUGO	155
	ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-HC/UFG	157
	ANEXO 3: Comitê de Ética em Pesquisa do HC/UFG	159
	ANEXO 4: Comitê de Ética em pesquisa do HUGO	160
	ANEXO 5: Artigo aceito para publicação na Journal of Food safety	161
	ANEXO 6: Artigo aceito para publicação na Food Science	167
	ANEXO 7: Fotos	184

RESUMO

Entende-se por nutrição enteral a alimentação para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes. As vantagens oferecidas pelo seu emprego muitas vezes tornam-se secundárias às complicações derivadas de sua utilização como a contaminação, que pode estar associada a complicações infecciosas. A contaminação microbiana das fórmulas enterais pode ocorrer em diversas etapas, sendo a manipulação uma etapa especialmente crítica. Tendo em vista a importância da dieta enteral como medida terapêutica em hospitais e a necessidade de se ofertar produtos com qualidade assegurada, devido aos prejuízos que a mesma pode causar aos pacientes, caso esteja contaminada, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária das dietas e seus ingredientes e caracterizar fenotipicamente, utilizando o antibiograma e, genotipicamente, através da eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* – (PFGE), isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a partir de manipuladores, água, módulo em pó e dieta enteral de dois hospitais públicos de Goiânia-GO visando estabelecer a possível fonte de microrganismos para o produto final. Um total de 80 amostras de dieta enteral e 140 swabs de mãos e fossas nasais de manipuladores foram coletadas no hospital 1 (H1) entre outubro/2007 e novembro/2008 e 80 amostras de dieta enteral e 80 swabs de mãos e fossas nasais no hospital 2 (H2) entre novembro/2008 e dezembro/2008. Nos dois hospitais foram coletadas também 40 amostras de água e módulo. Foram realizadas análises microbiológicas para contagem de microrganismos indicadores e potencialmente patogênicos. Os isolados de *E. coli* e *S. aureus* foram submetidos ao antibiograma e PFGE. De acordo com o antibiograma, todas as cepas de *S. aureus* isoladas (15) no H1 foram sensíveis à oxacilina, vancomicina, ciprofloxacina e gentamicina. O padrão de resistência foi observado em 10 (66,7%) isolados para penicilina, quatro (26,7%) para tetraciclina e nove (60,0%) para eritromicina, agrupando-os em seis diferentes perfis fenotípicos (A–F). Porém, a técnica não foi eficiente em determinar a origem da contaminação das dietas. Para as 20 cepas isoladas de *E. coli* do H1 e H2, todas (8) do H1 foram sensíveis ao trimetoprim, ciprofloxacina, cefalotina, gentamicina, ceftazidima e tetraciclina. Resistência foi observada em seis (75,0%) isolados para a ampicilina. No H2 todas as cepas isoladas (12) foram sensíveis ao trimetoprim, ciprofloxacina, gentamicina e ceftazidima e resistência foi observado em 11 isolados (91,7%) para a cefalotina e 12 (100,0%) para a tetraciclina e ampicilina, sendo agrupadas em quatro diferentes perfis fenotípicos (A–D). Os fenótipos A e C apresentaram microrganismos com o mesmo perfil fenotípico provenientes de manipuladores e dieta, sugerindo que nestes casos, a fonte de microrganismos para o produto final seria os manipuladores. A tipificação genotípica por PFGE originou sete perfis eletroforéticos diferentes para as cepas de *S. aureus* e cinco para as cepas de *E. coli*. De acordo com os resultados, duas cepas de *E. coli* isoladas da dieta foram idênticas a uma cepa isolada do manipulador do H2 e duas cepas de *S. aureus* isoladas da dieta foram iguais a uma cepa do manipulador do H1. Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que as dietas enterais apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias em ambos os hospitais e que o manipulador é provavelmente, uma das fontes de maior significância para a contaminação da dieta enteral em ambiente hospitalar.

ABSTRACT

Enteral feeding means the nutrition for special purposes, with controlled intake of nutrients. The advantages of its use often become secondary to complications arising from its contamination, which may be associated with infectious complications. The microbial contamination of enteral feeding may occur during all steps being the handling, particularly critical. Considering the importance of enteral feeding as a therapeutic tool in hospitals and the need to guarantee the microbiological quality of the products offered to critical patients, the present work aimed to evaluate the hygienic and sanitary quality of diets and their ingredients and to identify and characterize phenotypic and genotypically, using the antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis, strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* obtained from handlers hands and noses, water, module and enteral nutrition from two public hospital in Goiânia, Brazil in order to investigate the probable source of microbiological contamination. A total of 80 samples were collected from enteral nutrition and 140 from hands and noses of handlers involved in the diets manufacturing in hospital 1 (H1), between october/2007 and november/2008 and 80 samples from enteral nutrition and 80 from hands and noses of handlers in hospital 2 (H2), between october/2008 and november/2008. From both hospitals were collected 40 samples from water and module. The samples were submitted to microbiological analysis to verify the presence and numbers of pathogenic and indicator microorganisms. *E. coli* and *S. aureus* strains were submitted to antibiogram and PFGE. According to antibiogram, all *S. aureus* isolates (15) from H1 were susceptible to oxacillin, vancomycin, ciprofloxacin and gentamicin. Resistance profile was observed in 10 (66.7%) isolates for penicillin, four (26.7%) isolates for tetracycline and nine (60.0%) isolates for erythromycin, allowing to classify the strains in six different phenotypes (A-F), but it was not efficient for the determination of the bacterial source for the diets. In the H1, all (08) *E. coli* strains were susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, cephalothin, gentamicin, ceftazidime and tetracycline. Resistance was observed in six (75.0%) isolates for ampicillin. In H2, all strains isolated (12) were susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, gentamicin and ceftazidime and resistance was observed in 11 isolates (91.7%) for cephalothin and 12 (100.0%) for tetracycline and ampicillin, grouping them into five different phenotypes (A-D). Microorganisms showed the same phenotypic profile from handlers and diet samples (phenotypes A and C), suggesting that in these cases, the source of microorganisms for the final product was the food handler. The genotypic typing of *S. aureus* strains by PFGE generated seven different DNA banding profiles and the *E. coli* genotyping generated five profiles. Based on the results, two *E. coli* strains isolated from diets were identical to one strain isolated from food handler from H2 and two of *S. aureus* isolated from diets were identical to one strain isolated from food handler from H1. This study shows that the enteral feedings showed unsatisfactory sanitary-hygienic conditions in both hospitals and the hand contact is probably one of the sources of greatest significance for enteral diets contamination in the hospital environment.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como doenças, em geral, quer de natureza infecciosa ou tóxica, causadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos ou água. São consideradas um dos principais problemas de saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (World Health Organization – WHO 2007).

A magnitude das doenças causadas por microrganismos em alimentos é subestimada, tanto pelas pessoas em geral quanto por profissionais da área de saúde. Estima-se que, nos EUA, essas doenças resultem, anualmente, em 325.000 hospitalizações, 5.000 mortes e perdas econômicas da ordem de cinco bilhões de dólares. Além disso, os surtos relatados que envolvem poucos indivíduos são, geralmente, investigados de forma inadequada (Doyle 2000).

A transmissão de microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos via alimentos é particularmente importante quando ocorre em indivíduos hospitalizados. Aproximadamente 50,0% das infecções que acometem pacientes hospitalizados são causadas por microrganismos hospitalares que colonizam o trato gastrointestinal. Apesar disso, pouca importância é dada aos alimentos como fonte de microrganismos capazes de causar infecções hospitalares (Arias et al. 1998).

As infecções hospitalares (IH) existem desde que surgiram os hospitais (século XIX), devido à elevada incidência de doenças epidêmicas, que acometiam as comunidades pobres e, também, às precárias condições de higiene e de saneamento em que vivia a população (Muniz 2005).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS), através da Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, define IH como a infecção adquirida após a admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (Brasil 1998).

As IHs estão associadas a taxas expressivas de morbi-mortalidade bem como de maiores custos assistenciais. Os percentuais de infecções diferem de um país para outro, assim como de uma instituição para outra e, dependem de vários fatores relacionados à clientela (estado imunológico, nível cultural e

sócio-econômico), características do hospital (geral, universitário, particular, centro de referência, de pequeno, médio ou grande porte), e sistema de controle de vigilância epidemiológica das IH (Machado 2001, Pereira 2001).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 63 de 07 de julho de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a nutrição enteral (NE) consiste na administração de alimentos para fins especiais, através da ingestão controlada de nutrientes, de forma isolada ou combinada, com composição química definida ou estimada, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral. Este tipo de produto pode ser industrializado, ou não, utilizado de forma exclusiva ou parcial na substituição ou complementação da alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais. O seu uso pode ser em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, porém sempre visando à síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (Brasil 2000).

Diante da riqueza em macro e micronutrientes que apresentam as dietas enterais, estas se caracterizam como excelentes substratos para o desenvolvimento microbiano. Os agentes microrgânicos presentes neste ambiente podem, muitas vezes, agir como causadores potenciais de processos patológicos infecciosos. Independente da forma de administração é fundamental que sejam preparadas com maior cuidado para evitar contaminação (Waitzberg 2001) uma vez que os pacientes que fazem uso deste tipo de alimentação apresentam uma redução da capacidade de impedir a agressão orgânica microbiana, seja por insuficiência de barreira intestinal, seja por imunodepressão sistêmica (Costa et al. 1998).

Várias pesquisas relatam a contaminação microbiana de dietas enterais como possíveis causas de infecções clínicas como bacteremia, pneumonia, diarreia e enterocolite em pacientes imunodeprimidos, idosos e desnutridos. A principal complicação infecciosa é a gastroenterocolite, decorrente da contaminação microbiana, durante o preparo e administração das dietas. Nesse sentido, o preparo de dietas enterais não pode ser negligenciado nas atenções à saúde dos pacientes e necessita ser qualificado por programas de segurança alimentar, visando garantir a qualidade e a inocuidade dos produtos manipulados (Faintuch et al. 1990, Bussy et al. 1992).

Os programas de segurança de alimentos devem propiciar um controle de qualidade efetivo em toda a cadeia alimentar, desde a produção, processos de manipulação, armazenagem e distribuição até o consumo do alimento *in natura* e processado (Cavalli 2001).

Na tentativa de garantir a segurança dos alimentos nas diversas condições em que são elaborados, a WHO através do *Codex Alimentarius Commission* recomenda o uso do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), uma vez que esse método pode ser aplicado em todas as etapas da cadeia alimentar na identificação e caracterização dos pontos críticos em que ocorrem riscos e para estabelecer prioridades de intervenção e controle (Bryan et al. 1997, WHO 2001, 2003).

No Brasil, a implantação do sistema APPCC passou a ser exigida pela Portaria 1.428 de 23/11/1993 do MS a todos os estabelecimentos que manipulam alimentos, reconhecendo o sistema APPCC como sendo essencial para garantir a inocuidade e a qualidade dos alimentos (Brasil 1993, Madeira & Ferrão 2002).

Para estudar as relações entre organismos patogênicos e alimentos podem ser empregados métodos de tipificação microbiana através da caracterização de linhagens de microrganismos, evidenciando diferenças dentro da mesma espécie. Para tanto, são utilizadas técnicas fenotípicas, baseadas na expressão das características dos microrganismos e técnicas genotípicas, baseadas na análise do DNA destes microrganismos (Arbeit 1999). Estas técnicas são importantes ferramentas na investigação epidemiológica de surtos de origem alimentar, permitindo a identificação da fonte da contaminação para os alimentos bem como a adoção de medidas focadas nos problemas levantados, visando o controle sanitário dos alimentos, garantindo maior segurança ao indivíduo (van Belkum et al. 2001).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A ingestão de nutrientes constitui atividade essencial à manutenção da vida. A relação direta entre ingestão alimentar deficiente e doença foi, provavelmente, observada por nossos antepassados mais primitivos. Algumas das primeiras citações na literatura de que se dispõe sobre a importância do suporte nutricional pertencem a Hipócrates (460 – 377 a.C.). Á Cláudio Galeno (130 – 210 d.C.), cujos ensinamentos influenciaram o pensamento médico durante os 15 séculos seguintes, atribui-se a frase: “A saúde depende da escolha dos alimentos” (Oliveira & Moron 1997).

A Idade Média testemunhou o acúmulo progressivo dos conhecimentos de anatomia, bem como a utilização de numerosas técnicas (suturas, drenagens, curativos) utilizadas até nossos dias. Henri de Mondeville, em sua obra *Cirurgia* (1306), reconhecia a importância do estômago e intestino delgado na ingestão dos alimentos. Por outro lado, o portador de afecção cirúrgica que impedisse a ingestão adequada de alimentos por via oral estava virtualmente condenado à morte por inanição. Tornava-se necessário recorrer a dispositivos engenhosos, como o descrito por Thomas Willis (1672), em sua *Pharmaceutica Rationalis*. Utilizando “barbatana” de baleia, o autor confeccionou instrumento que permitiu a introdução de alimentos no estômago, em portador de acalásia da cárdia (alteração neuromuscular hipertônica do mecanismo esfinteriano da cárdia, causando dificuldade de passagem do alimento do esôfago para o estômago), por período de 15 anos (Oliveira & Moron 1997).

A utilização de sondas gomadas, efetuada esporadicamente em períodos anteriores, tornou-se extensiva na segunda metade do século XVIII, como medida terapêutica em obstruções do trato digestivo alto. Assim, Hunter descreve a administração de nutrientes por esse método em pacientes portadores de “paralisia dos músculos da deglutição”. A segunda metade do século XIX marcou o início da prática da medicina como se conhece hoje (Oliveira & Moron 1997). Nesse período, a necessidade da nutrição em pacientes hospitalizados foi reconhecida por Graves, que assinalou que o jejum, então prática corrente em pacientes com febre, contribuía na realidade

para o agravamento da doença. Graves preconizou uma dieta à base de água com açúcar, caldo de carne, torradas e geléia (valor calórico de aproximadamente 300 Kcal), a pacientes com sépses e tireotoxicose. Duas décadas depois, Coleman e Dubois utilizaram métodos calorimétricos diretos e indiretos para quantificar as necessidades energéticas de vítimas de febre tifóide. Seu trabalho conduziu à recomendação de dietas ricas em carboidratos e proteínas, fornecendo até 4.000 Kcal/dia. Entretanto, tais volumes calóricos raramente podiam ser obtidos apenas com a ingestão oral de alimentos, desde que a anorexia é um componente na maioria das doenças. Por outro lado, alguns pacientes apresentavam restrições mecânicas à ingestão de nutrientes. Assim, paralelamente ao reconhecimento da necessidade de suporte nutricional, a cirurgia digestiva propôs os meios técnicos para torná-lo possível. Assim a NE veio a conhecer novo impulso no século XIX, com a realização das primeiras ostomias, como a gastrostomia e jejunostomia, executadas com sucesso no homem pela primeira vez por Verneuil (1876) e Surmay (1879), respectivamente (Oliveira & Moron 1997).

O informativo da Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE 2000) afirma que a nutrição enteral tem sido utilizada desde épocas remotas. Cita que o primeiro caso de alimentação por sonda foi realizado por Copivacceus em 1958. Desde então, muito se tem feito em relação à Terapia Enteral. Com o avanço tecnológico, o programa espacial em 1960 e a valorização de tal via, muito aconteceu e mudou-se no curso desta terapêutica.

Após um período de pouca aceitação do método, devido principalmente às complicações provindas do uso de dietas inadequadas, houve um ressurgimento da NE, graças ao grande avanço da Nutrição Clínica, ao aprimoramento das dietas e ao aperfeiçoamento das sondas (Leandro 1990).

Anteriormente, o aparecimento de novas técnicas para administração da NE, e o surgimento de novas e variadas formulações enterais, contribuíram para a maior utilização destas dietas, tornando-a prática comum em muitos hospitais (Costa et. al. 1998).

2.2 ALIMENTAÇÃO HOSPITALAR ESPECIAL – DIETAS ENTERAIS

O alimento, independentemente da cultura do indivíduo e da época vivida, é um fator essencial e indispensável à manutenção e à ordem da saúde.

Sua importância está associada à sua capacidade de fornecer ao corpo humano, nutrientes necessários ao seu sustento. Para o equilíbrio harmônico desta tarefa é fundamental a sua ingestão em quantidade e qualidade adequadas, de modo que funções específicas como a plástica, a reguladora e a energética sejam satisfeitas, mantendo assim a integridade estrutural e funcional do organismo. No entanto, esta integridade pode ser alterada, em casos de falta de um ou mais nutrientes, com conseqüente deficiência no estado nutricional e necessidade de suplementação (regime dietoterápico) (Moura & Reyes 2002).

A NE consiste na administração de alimentos para fins especiais por meio de uma dieta líquida conduzida através de uma sonda colocada no estômago ou no intestino (Brasil 2000).

As dietas enterais têm sido item de constante inovação graças ao aprimoramento de técnicas e conhecimentos adquiridos sobre o papel da nutrição na doença. Isto tornou possível várias mudanças em relação à forma de apresentação, modo de preparo e composição dos nutrientes contidos nas fórmulas enterais (Santos & Tondo 2000).

As formulações dietéticas podem ser confeccionadas através da manipulação de produtos industrializados ricos em calorias e proteínas e/ou com produtos *in natura*, ou também se utilizar fórmulas prontas existentes no mercado (Augusto et al. 1993).

As dietas naturais ou artesanais, segundo Domene e Galeazzi (1997), são formulados preparados pelos serviços de nutrição ou domiciliarmente, pela cocção e/ou mistura de alimentos. São dietas que podem apresentar composição química variável de acordo com o procedimento de preparo (tempo e técnica de cocção, filtragem do preparado) e maior risco de contaminação, decorrente da manipulação inadequada dos alimentos.

As dietas enterais industrializadas surgiram no mercado sob duas formas de apresentação, tais como as dietas em pó – necessitando de reconstituição ou diluição e as dietas líquidas – prontas para o uso (Costa et al. 1998). Estas dietas podem ser administradas por meio de sistema aberto ou fechado (Costa et al. 1998). O sistema aberto seria aquele em que a fórmula requer manipulação prévia à sua administração, para uso imediato ou atendendo à orientação do fabricante, e, o sistema fechado constituiria aquele

no qual se utilizaria a NE industrializada, esterilizada, acondicionada em recipiente hermeticamente fechado, apropriado para conexão ao equipo de administração (Brasil 2000).

Ademais, a NE apresenta-se como importante fator de risco para infecções adquiridas em setor hospitalar (Thurn et al. 1990, Waitzberg 2001). São considerados como potenciais causas de contaminação de dietas enterais, os seguintes elementos: I- ingredientes não estéreis, II- manipulação, III- período de administração prolongado, IV- uso prolongado ou reutilização do sistema de infusão, e V- outros equipamentos utilizados no seu preparo (Belknap et al. 1990, Graham 1993).

Segundo Wagner et al. (1994), há um número maior de microrganismos em fórmulas artesanais e comerciais manipuladas do que em fórmulas não manipuladas. Os microrganismos mais comuns em ambientes clínicos são: espécies de *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter (E. cloacae)*, *Bacillus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* e *Escherichia coli*, entre outros, e a possibilidade de contaminação durante a mistura e decantação da fórmula enteral ocorre, principalmente, pela falta de técnicas de higiene durante o trabalho dos manipuladores, inabilidade para desinfetar equipamentos de preparação e aditivos não esterilizados ou contaminados adicionados à dieta.

A Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral realizou no ano de 1996 o Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar – IBRANUTRI. O estudo realizado em 4.000 pacientes internados na rede pública hospitalar de 12 estados brasileiros e do Distrito Federal verificou que a prevalência de desnutrição hospitalar era de aproximadamente 50,0% dos quais 12,6% foram portadores de desnutrição grave (Correia et al. 1998).

Geralmente, os pacientes em uso de nutrição enteral são em sua maioria pacientes críticos e desnutridos, os quais possuem dificuldades em impedir agressão orgânica microbiana, seja por insuficiência da barreira intestinal ou por imunodepressão sistêmica. Nestes pacientes ocorre, perda substancial da massa intestinal após curto período de redução na ingestão nutricional, seguida de atrofia de mucosa, permitindo maior permeabilidade intestinal e conseqüentemente, translocação bacteriana (Waitzberg 2001). Pacientes desnutridos são mais susceptíveis às infecções, atraso no processo

de cicatrização, falência de múltiplos órgãos e período de hospitalização prolongado. Deve-se considerar também que deficiências de IgA (Imunoglobulina A) podem alterar a composição da microbiota normal e conseqüentemente aumentar o risco de infecção. A secreção de IgA é influenciada pela nutrição e indiretamente por todos os fatores que determinam a dieta do paciente (Pedruzzi 2002).

A mucosa do intestino delgado de indivíduos saudáveis é colonizada por uma microbiota normal, com contagens de aproximadamente 10^3 UFC/mL no intestino delgado proximal podendo atingir até 10^8 UFC/mL no intestino grosso (Trabulsi 2000). O controle qualitativo e quantitativo dessa microbiota ocorre por diferentes mecanismos como peristaltismo, *turnover* celular da mucosa, presença de sais biliares, antagonismo com microrganismos exógenos e, ainda, pelo estímulo a células de defesa (Berg 1996). Vários fatores que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal podem permitir o desenvolvimento de superpopulação bacteriana e colonização por patógenos oportunistas. Entre estes fatores, destacam-se a exposição a antimicrobianos, antiácidos, bloqueadores de histamina, uso de difenoxilato, vagotomia, uso de imunossupressores e desnutrição grave, entre outros (Ferreira et al. 2001).

Na Terapia de Nutrição Enteral (TNE), a administração de dietas eventualmente contaminadas pode estar associada não somente a distúrbios gastrintestinais, mas principalmente os pacientes imuno-comprometidos podem ser também acometidos por infecções mais graves como pneumonia e sepse (Oliveira et al. 2001).

Apesar de o trato gastrintestinal ser utilizado sempre que possível, ou seja, a alimentação pela via enteral é a primeira escolha na terapia de suporte nutricional do paciente, pode tornar-se importante via para a invasão de patógenos e estabelecimento de infecção hospitalar. O cuidado com detalhes, às vezes, aparentemente de menor importância, como o estabelecimento e manutenção da via de acesso apropriada, o preparo, a conservação e a administração da dieta, são responsáveis pelo sucesso da prevenção das complicações infecciosas, quando se utiliza a NE (Correia et al. 2005).

No último século a TNE tem se tornado um tratamento valioso tanto em ambiente hospitalar como domiciliar. Entretanto, não acontece sem complicações e a mais comum destas é a diarreia, que ocorre em mais de

25,0% dos pacientes em enfermaria geral e em 63,0% daqueles em unidade de terapia intensiva. A patogênese permanece desconhecida, embora vários fatores tenham sido implicados, incluindo dietas contaminadas, intolerância à lactose, antibioticoterapia, medicamentos osmoticamente ativos e coexistência de hipoalbuminemia (Bowling 1998).

Dietas enterais altamente contaminadas, contendo de 10^3 a 10^9 Bacilos Gram Negativos (BGN) /mL, têm sido relacionadas como causa, não somente de diarreia, mas também de sepse, pneumonia e infecção do trato urinário (Okuma et al. 2000). Além disso, consideráveis evidências indicam que a dieta enteral contaminada com bactérias pode ser causa de infecção nosocomial grave (Arias et al. 2003).

As dietas enterais se comportam como excelentes meios de cultura e favorecem a multiplicação dos microrganismos devido à sua composição, pois são ricas em macro e micro-nutrientes, possuem pH em torno de 7,0 e elevada atividade de água (Waitzberg 2001). No caso das dietas artesanais e industrializadas em pó, em virtude de uma maior manipulação durante o preparo, a contaminação pode atingir números expressivos e se torna um risco para o paciente (Carvalho 1998, Carvalho et al, 2000).

A ANVISA, através da Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 63 de 06 de julho de 2000 determina que a manipulação da nutrição enteral deva ser realizada com técnica asséptica, seguindo procedimentos escritos e validados e estabelece a necessidade da existência de um rigoroso acompanhamento das condições de preparo, o qual deve ser realizado através de controles microbiológicos do processo (Brasil 2000).

No Brasil foram relatados casos de dietas enterais contaminadas, sendo que as dietas artesanais e em pó apresentaram porcentagens maiores de inadequação quando comparadas com dietas prontas para o uso. Os principais pontos críticos de controle identificados foram a higienização e desinfecção de utensílios e equipamentos, o tempo de preparo associado com a temperatura do produto final e exposição em temperatura ambiente, a temperatura de refrigeração, a qualidade da água, a higiene e a anti-sepsia de manipuladores e a higienização e desinfecção externa de embalagens (Carvalho et al 2000, Kessler et al. 2000, Oliveira et al. 2000, Santos & Tondo 2000, Mitne et al. 2001).

Faintuch et al. (1990), pesquisaram contaminantes aeróbios e anaeróbios presentes nas preparações de NE de hospitais da cidade de São Paulo. A cultura inicial revelou 50,0% de positividade microbiana, porém parte desta contaminação era devida às espécies de BGN. Após oito horas de armazenamento os índices observados revelaram-se de ordem de 90,0%, ainda com presença expressiva de BGN. Depreende-se que imediatamente após o manuseio, as dietas se contaminavam em proporções de até 50,0%, atingindo níveis de até 94,0% decorridas 24 horas.

Belknap et al. (1990), constataram que, os pacientes que receberam fórmulas líquidas ou em pó, apresentaram significativamente maior frequência e contaminação bacteriana que o grupo que recebeu fórmula asséptica, sendo consistente a associação entre contaminação e o grau de manipulação da fórmula. A presença de dois organismos (*Enterococcus* e Leveduras) foi implicada em alguns casos de diarreia.

Com o propósito de determinar se a contaminação da fórmula enteral aumenta quando as bolsas de administração eram usadas por 24 horas e depois por um período adicional de 48 horas, Kohn (1991), em Chicago, EUA, realizou um trabalho, em laboratório, sobre a relação entre a contaminação da fórmula enteral e o tempo de administração em bolsas. De 21 bolsas, 23,8% e, 42,9% foram inaceitáveis em 24 e 48 horas respectivamente, sugerindo que não se devem usar estas bolsas de administração por mais de 24 horas.

Os resultados do trabalho de Costa et al. (1998), concluíram que a dieta artesanal modular apresentou contaminação microbiana por bactérias gram-negativas (espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*); dieta artesanal modular e em pó industrializada apresentaram bolores e leveduras e coliformes totais, e, dietas enterais líquidas não apresentaram contaminação bacteriana até 24 horas de administração em temperatura ambiente.

Thurn et al. (1990), em St. Paul, EUA, relataram que muitos estudos tem demonstrado que o uso de técnicas assépticas no preparo, pode reduzir a contaminação da alimentação enteral. Esta pode ocorrer no departamento dietético ou no local de atendimento ao paciente e pode envolver organismos carreados das mãos de funcionários.

Hunskins et al (2004) enfatizam que melhorias nas condições de facilidades hospitalares, equipamentos, insumos, procedimentos e as práticas

de cuidados com os pacientes, possuem um impacto no risco de infecção nosocomial em países de recursos limitados. Organizações internacionais como o *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) através do *Codex Alimentarius* (1993) recomendam a utilização do sistema APPCC para garantir a segurança microbiológica de alimentos e reforça a importância da monitorização regular das práticas e procedimentos envolvidos no fornecimento de nutrição enteral para pacientes.

O APPCC é um sistema preventivo que envolve a análise das diferentes etapas de elaboração de determinado alimento, iniciando desde a seleção e compra de ingredientes até atingir o consumidor final, sendo identificados os perigos associados com a manipulação do produto em cada estágio do processo. É então construído um fluxograma que resume o processo, permitindo identificar os pontos onde um controle maior deve ser estabelecido, estes pontos são considerados Pontos Críticos de Controle, ou seja, pontos onde procedimentos imediatos de controle podem ser exercidos para eliminar, prevenir ou reduzir os perigos até níveis aceitáveis. O próximo passo é o estabelecimento de critérios a serem seguidos e de ações corretivas a serem tomadas sempre que os critérios não forem atingidos, a monitorização periódica destes pontos críticos de controle possibilita a tomada de medidas preventivas apropriadas impedindo que o perigo atinja o consumidor final (Anderton 1993).

Essa característica preventiva torna o sistema APPCC especialmente importante quando se trata de nutrição enteral, visto que o resultado da análise microbiológica de dietas prontas é definido tardiamente, ou seja, quando as dietas já foram infundidas no paciente.

2.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA E LEGISLAÇÃO ATUAL

As ações de vigilância sanitária constituem tanto uma ação de saúde quanto um instrumento da organização econômica da sociedade. Com a intensa produção e circulação das mercadorias, os riscos à saúde ocorrem em escala ampliada: as consequências de produtos defeituosos colocados no mercado podem afetar a saúde de milhões de indivíduos, a credibilidade dos produtos e das instituições públicas encarregadas do controle sanitário, provocando enormes prejuízos econômicos. Nesse sentido, a ação protetora

de um sistema público de vigilância sanitária abarca não apenas os cidadãos, mas também os produtores (Costa 2006).

No Brasil, a estruturação das atividades de fiscalização da vigilância sanitária ocorreu nos séculos XVIII e XIX visando a princípio, evitar a propagação de doenças nos agrupamentos urbanos que estavam surgindo. No final do século XIX, suas ações foram reestruturadas, impulsionadas pelas descobertas nos campos da bacteriologia e terapêutica (Lucchese 2001).

A partir da década de 80, as atividades da vigilância sanitária foram integradas, conforme preceito constitucional, sendo concedido ao Estado o papel de detecção de infrações sanitárias, a fim de proteger a saúde da população. Entretanto, até o início de 90, suas ações no controle de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos restringiam-se à coleta de amostras do produto final para análise laboratorial (Passos & Kuaye 1996).

As ações de vigilância sanitária abrangem cada vez mais categorias de objetos de cuidado, partilhando competências com órgãos e instituições de outros setores que também desenvolvem ações de controle sanitário. Compõe-se de um conjunto de saberes de natureza multidisciplinar e práticas de interferência nas relações sociais produção-consumo para prevenir, diminuir ou eliminar riscos e danos à saúde relacionados com objetos historicamente definidos como de interesse da saúde. Tendo por objeto a proteção e defesa da saúde individual e coletiva, cabe à vigilância sanitária desenvolver ações articuladas em políticas públicas voltadas para a crescente qualidade de vida (Costa 2006).

A recomendação do APPCC pelo Ministério da Saúde, em 1993, deu início a um controle de qualidade em toda a cadeia alimentar, visando melhorar a qualidade dos produtos expostos ao consumo (Passos & Kuaye 1996). Contudo, alguns desses instrumentos ainda não fazem parte das práticas vigentes na cultura institucional da vigilância sanitária no Brasil. Alguns vêm sendo exigidos pela legislação sanitária, mas ainda não são executados e alguns deles começam a fazer parte das práticas institucionais na esfera federal e estadual (Costa 2006).

A Resolução-RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA/MS estabeleceu, o “Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos” destinados ao consumo humano, indispensáveis

para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, para a aplicação do sistema de APPCC e para análise microbiológica de produtos alimentícios (Brasil 2001).

Coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, aeróbios mesófilos e *Salmonella* sp. são exemplos de microrganismos pesquisados em dietas enterais, e os produtos que não atenderem aos padrões microbiológicos vigentes, poderão ser incriminados em surtos de DTA, o que demonstra a necessidade de um efetivo controle higiênico-sanitário destes expostos ao consumo por pacientes debilitados (Passos & Kuaye 1996, Brasil 2001).

2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO CONTROLE DE QUALIDADE

Os alimentos são qualificados como próprios ou impróprios ao consumo humano, de acordo com valores estabelecidos pelos critérios microbiológicos, que são elaborados pela legislação de cada país, ou são definidos em nível internacional pela comissão do *Codex Alimentarius*, do programa Food and Agricultural Organization/World Health Organization (FAO/WHO), e pela ICMSF que, por sua vez, agem principalmente no estabelecimento de métodos analíticos e de planos de amostragem (Spers & Kassouf 1996, Munuera et al. 1997, Brasil 2001).

De acordo com a legislação estabelecida pela RDC nº. 12/ANVISA (Brasil 2001), os critérios para estabelecimento de padrões microbiológicos sanitários em alimentos podem ser considerados isoladamente ou em conjunto e são compostos pelos seguintes itens:

- Grupos de microrganismos ou suas toxinas consideradas de interesse sanitário;
- Alimentos classificados segundo o risco epidemiológico;
- Métodos de análise que permitem a determinação dos microrganismos;
- Plano de amostragem, no qual se define o número e tamanho de unidades de amostras a serem analisadas;
- Normas, padrões e especificações para os microrganismos.

As normas microbiológicas devem basear-se em profundo conhecimento da ecologia microbiana, com intuito de se estabelecer os limites

de tolerância ou valores máximos admissíveis para cada produto submetido à análise, já que é esta pesquisa de microrganismos que vai determinar se o produto está ou não adequado do ponto de vista sanitário e de saúde pública. Além disso, estes limites recomendados são utilizados pela indústria alimentícia para monitoramento dos pontos críticos de controle de todo o processo produtivo ou das boas práticas de produção adotadas (Franco & Landgraf 2003, Munuera et al. 1997).

De uma maneira geral, os métodos para a análise microbiológica empregada que seguem as determinações preconizadas pelos organismos internacionais citados no item 2.5 e pela legislação brasileira federal (RDC 63, 2000), recomendam a contagem ou pesquisa de microrganismos e seus limites aceitáveis para dietas enterais, utilizando dietas industrializadas em pó e módulos de nutrientes em pó para composição destas dietas, que devem ser submetidas à avaliação microbiológica em amostra representativa das preparações realizadas em uma sessão de manipulação, devendo atender aos seguintes limites microbiológicos:

- Microrganismos aeróbios e mesófilos menores que 10^3 UFC/mL;
- Coliformes a 35°C/mL menores que 3 UFC/mL;
- *E. coli* : menor que 3 UFC/mL;
- *Staphylococcus* coagulase-positiva menor que 50 UFC/mL;
- *B. cereus*: menor que 10^3 UFC/mL.
- *Clostridium perfringens* menor que 10^3 UFC/mL
- *Salmonella* sp ausente em 25mL
- *Listeria monocytogenes* ausente em 25mL
- *Yersinia enterocolítica* ausente em 25mL

A preparação da NE deverá ser de acordo com as recomendações das Boas Práticas de Preparação de Nutrição Enteral (BPPNE), estabelecidos pela RDC nº 63/ANVISA/MS. As boas práticas de preparação apresentam as orientações gerais para aplicação nas operações de preparo da NE, bem como critérios para aquisição de insumos, materiais de embalagem e NE industrializada. É indispensável a efetiva inspeção durante todo o processo de

preparação para garantir a qualidade do produto a ser administrado (Brasil 2000).

No contexto exposto, o padrão microbiológico vigente é um critério obrigatório e o não atendimento deste constitui violação da lei, sendo possível a adoção de medidas legais por parte dos órgãos competentes (Brasil 2001).

2.5 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES

Microrganismos patogênicos como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas aeruginosa* são diferenciados quanto às suas características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Sua manutenção e proliferação em alimentos são dependentes de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos (Ingram & Simonsen 1985, Bell et al. 1994, Centers for Disease Control and Prevention-CDC 1995, Garcia 1996).

2.5.1 Microrganismos aeróbios mesófilos

Microrganismos aeróbios mesófilos são todos aqueles (bactérias, fungos e leveduras) capazes de crescer em temperaturas de 35-37°C em condições de aerobiose. Esses microrganismos indicam a qualidade com que o alimento foi obtido ou processado, e sua presença em altas contagens é indicativa de procedimento higiênico inadequado na produção, no beneficiamento ou na conservação, dependendo da origem da amostra. Também se deve considerar que a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e, portanto, uma alta contagem de aeróbios mesófilos pode significar que houve condições para o crescimento de patógenos (Franco & Landgraf 2003).

Muniz (2005) ao pesquisar a qualidade microbiológica de dietas enterais de um hospital universitário da cidade de Uberlândia constatou que 62,5% das dietas encontravam-se contaminadas por estes microrganismos, indicando condições higiênicas impróprias, sugerindo a necessidade de maiores cuidados durante o processamento das dietas e adequações nas boas práticas de produção das mesmas.

2.5.2 Bolores e leveduras

Os fungos são organismos eucarióticos que revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições de umidade e temperatura extremamente variáveis. São pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razão pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de alimento (Lazzari 1997). São considerados decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres, participam de importantes associações simbióticas com plantas vasculares (micorrizas), constituem a avassaladora maioria dos patógenos de plantas e são cruciais para a biotecnologia industrial (Li et al. 2000).

Os fungos podem ser incluídos em dois grandes grupos, sendo os pluricelulares ou filamentosos (bolores) e os unicelulares (leveduras). Nos bolores, a unidade fundamental é a hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio, que exerce função de assimilação, nutrição e fixação, podendo diferenciar-se em estruturas de frutificação, que servem à sua propagação (Corrêa et al 1997).

Os bolores podem formar colônias com aspectos diversos, que variam de seco e pulverulento a úmido e gelatinoso. O micélio é usualmente incolor e as diferentes tonalidades das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, resultando em colorações verde, verdeazulada, laranja, castanha, cinza ou preta. Particularmente nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* e *Rhizopus* essas colorações são bastantes características e auxiliam na identificação de gêneros e espécies (Trabulsi 2000).

Os fungos são amplamente utilizados em processos fermentativos, como fabricação de cerveja e vinho e produção de antibióticos e vitaminas. Contudo, algumas espécies podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis. Também podem ocasionar manifestações clínicas no homem e nos animais como infecções ou doenças decorrentes da invasão de tecidos, alergias ou reações de hipersensibilidade, além de toxicoses, intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo micotoxinas (Corrêa 1998).

Micotoxina designa um grupo de metabólitos secundários produzidos por determinadas espécies de fungos filamentosos. Estes metabólitos secundários são quimicamente diversos e podem estar contidos no interior dos esporos, em

seus micélios, ou então serem liberados no alimento contaminado por estes microrganismos (Corrêa 1998).

Cerca de 300 micotoxinas produzidas por pelo menos 350 espécies de fungos já foram identificadas. Suspeita-se que quase todos os fungos, se testados, mostrariam alguma espécie de toxicidade e que todos os alimentos e rações susceptíveis à produção de fungos podem ser potencialmente contaminados sob condições ambientais apropriadas (Sabino 1995). As micotoxinas mais importantes podem ser divididas em três grandes grupos: aflatoxinas, produzidas pelo gênero *Aspergillus* (espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*); fusariotoxinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, representadas pela zearalenona, tricotecenos e fumonisinas; e ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e algumas espécies do gênero *Penicillium* (Moraes 2003).

Segundo Pinto et al (2001) os alimentos contaminados por microrganismos causadores de doenças, ao serem ingeridos, permitem que os patógenos ou seus metabólitos invadam os fluídos ou tecidos do hospedeiro causando doenças graves. A intoxicação por micotoxinas é chamada de micotoxicose, que pode causar ao organismo do animal e/ou de humanos danos no crescimento, afetando funções do organismo e desenvolvendo tumores, podendo, inclusive, ser letal. Os órgãos mais freqüentemente afetados são o fígado, os rins, o cérebro, os músculos e o sistema nervoso.

Os sintomas vão desde náuseas e vômitos até a falta de coordenação dos movimentos (ataxia) e morte (Pinto et al 2001).

Em função do perigo que constitui a presença de micotoxinas em alimentos para o consumo humano, os limites máximos de tolerância em países europeus e nos Estados Unidos da América (EUA) são muito rígidos. Já no Brasil a legislação estabelece padrão apenas para amendoim e derivados (Li et al. 2000).

No Brasil, dados sobre contaminação fúngica são suficientemente abundantes além da presença dos microrganismos, relatados na literatura, as condições climáticas do Brasil propiciam a produção de toxinas fúngicas. O processamento e o armazenamento de alimentos podem alterar a microbiota, porém as micotoxinas permanecem no produto e podem estar relacionadas com outros fatores abióticos aos quais o mesmo foi exposto. Além disto, a

constatação de fungos em alimentos é indicativa de má qualidade da matéria-prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento (Moraes 2003).

2.6 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS GRAM – NEGATIVOS

2.6.1 *Salmonella* sp.

A *Salmonella* é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil. A salmonelose constitui um dos principais problemas de saúde pública e representa um custo significativo em muitos países, com milhões de casos relatados a cada ano e milhares de óbitos (Minor 1984, WHO 2005).

O gênero *Salmonella* inclui várias espécies e sorotipos patogênicos para o homem e outros animais. Este gênero pertence à família *Enterobacteriaceae* e as principais fontes da bactéria são as fezes humanas e de animais. É constituído por bastonetes medindo 0,5 a 0,7 μm por 1,0 a 3,0 μm , móveis por flagelos peritríquios, não esporulados e anaeróbios facultativos. Os sorotipos mais importantes incluem a *Salmonella* Typhi, e os sorotipos associados às infecções alimentares como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Newport. Os alimentos mais susceptíveis à contaminação por salmonelas são: leite, queijos, chocolates e carnes frescas (Minor 1984, FDA 2008a, Pinto 2006).

Mais de 2.500 sorotipos de *Salmonella* foram descritos no esquema de Kauffman-White, com base nos seus antígenos somáticos e flagelares. Os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, *S. Derby* e *S. Anatum* são os mais freqüentemente isolados. A partir de 1991, observou-se um aumento gradual dos isolados de *S. Enteritidis*, devido ao consumo maior de alimentos contaminados (Cogco et al. 2000, Koneman et al. 2001, WHO 2005).

Nos Estados Unidos uma estimativa de 1,4 milhões de casos de salmonelose são relatados anualmente resultando em mais de 16.000 hospitalizações e 580 óbitos. Entre 1998-2002 houve um total de 6.647 surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados. Entre os 2.167 (33,0%) surtos em que a etiologia foi determinada, a *S. Enteritidis* foi o patógeno responsável pelo maior número de casos (55,0%). Em 2006 um total de 1.270

surtos foram notificados, resultando em 27.634 casos e 11 mortes. Entre os 624 surtos com a etiologia confirmada, a *Salmonella* foi responsável por 18,0% dos surtos e 3.252 casos (CDC 2006);

No Brasil, segundo o Serviço de Vigilância em Saúde (SVS) do MS, no período de 1999-2008 ocorreram 6.062 surtos de DTA sendo a *Salmonella* o agente responsável pela maior ocorrência de surtos (1.275), sendo o ovo cru ou mal cozido responsável por 910 desses episódios. Entretanto, 867 surtos não tiveram o alimento identificado (Brasil 2008).

Em pesquisas realizadas com dietas enterais, Oliveira et al (2000) e Maurício et al (2005) não detectaram a presença de *Salmonella* em amostras coletadas de dietas. Entretanto, Pinto et al (2004) constataram que 11,0% de suas amostras estavam contaminadas por este microrganismo, alertando para a necessidade de implantação de um rigoroso sistema de controle de qualidade nas áreas de manipulação das dietas, a fim de aumentar a segurança de alimentos dos pacientes hospitalizados

2.6.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, sendo uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Esta espécie é caracterizada por células em forma de bastonetes retos, medindo 1,1 a 1,5 µm por 2,0 a 6,0 µm, móveis com flagelos peritríquios, ou imóveis, não esporulados e anaeróbios facultativos (Brenner 1986).

As cepas patogênicas intestinais são classificadas, de acordo com os determinantes de virulência, em seis categorias distintas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* aderente-difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro & Kaper 1998, Kaper et al. 2004, Schroeder et al. 2004). Quanto às cepas extra-intestinais, chamadas de ExPEC, as mais comuns são as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) responsáveis por infecções do trato urinário e os patótipos associados à meningites e sepse (Russo & Johnson 2000).

A *E. coli* coloniza tipicamente o sistema gastrointestinal de crianças com poucas horas de vida. Usualmente permanece confinada, como comensal, no lúmen intestinal, entretanto, em indivíduos debilitados ou imunocomprometidos,

ou quando as barreiras gastrintestinais são violadas, também cepas não patogênicas podem causar infecção. Mesmo seres humanos saudáveis são susceptíveis à infecção por um dos muitos clones altamente adaptados de *E. coli*, que adquirem atributos de virulência específicos, lhes conferindo uma grande habilidade de se ajustar a novos nichos, os quais juntos desenvolvem possibilidades de causar um amplo espectro de doenças humanas. As doenças causadas pelas cepas patogênicas podem ser limitadas à superfície da mucosa ou podem disseminar pelo organismo. Três síndromes clínicas resultam de infecção inerente às cepas patogênicas – infecção do trato urinário, meningite e sepse, e doença entérica/ diarreica (Nataro & Kaper 1998, Silva & Silva 2005).

Anualmente, a *E. coli* é responsável pela ocorrência de 73.000 doenças nos EUA. De acordo com dados do CDC, entre 1982-2002, 49 estados relataram 350 focos, representando 8.598 casos, 1.493 (17,0%) internações, 354 (4,0%) casos de síndrome hemolítica urêmica, e 40 (0,5%) mortes. A transmissão de origem alimentar foi responsável por 52% dos casos, 21,0% teve causa desconhecida e 9,0% foi por água. Atualmente o CDC estima que a cada ano pelo menos 2.000 americanos são hospitalizados e cerca de 60 morrem em consequência direta de infecções por *E. coli* e suas complicações. Um estudo recente estima que o custo anual com doenças causadas por *E. coli* é em torno de 405 milhões de dólares, sendo 370 milhões para mortes prematuras, 30 milhões para assistência médica e cinco milhões para a perda de produtividade (Olsen et al. 2000, CDC 2006).

No Brasil entre 1999-2008 a *E. coli* foi responsável por apenas 6,0% dos surtos de DTA (Brasil 2008). Lima et al (2005) objetivando avaliar a qualidade microbiológica de dietas enterais em sistema aberto manipuladas em um hospital na cidade de Natal-RN, evidenciaram contaminação por coliformes totais e *E. coli* em 25,0% e 10,0% das amostras analisadas respectivamente

Em maio de 2009 o CDC informou sobre um surto de infecções causadas pela *E. coli* em decorrência do consumo de massa crua de biscoito. Setenta pessoas de 30 Estados americanos foram infectadas, 30 pessoas foram hospitalizadas, sendo que sete desenvolveram síndrome hemolítica urêmica (CDC 2009).

A presença de *E. coli* patogênica em alimentos e água representa um significativo problema em saúde pública. A transmissão de elementos de

virulência entre as *E. coli* contribuem para o aumento de sua patogenicidade e diversidade (Donnenberg & Whittam 2001). Sendo um microrganismo muito dinâmico, possui capacidade de transferência horizontal de genes que aumenta sua diversidade genética e, sob certas circunstâncias, este fato pode levar à emergência de novas cepas patogênicas (Donnenberg & Whittam 2001, Maldonado et al. 2005). Podem também transferir genes de resistência antimicrobiana a outras bactérias (Zhao et al. 2001), assim, elas são importantes na disseminação de resistência antimicrobiana entre a microbiota intestinal e para outros patógenos relacionados a alimentos (Schroeder et al. 2003). A presença de *E. coli* em algum alimento indica que esta contaminação microbiana pode ser de origem fecal e, portanto, este alimento está em condições higiênicas insatisfatórias ocasionando risco à saúde animal e humana (Babák et al. 2005).

2.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete não fermentador da glicose que pode ser isolado do solo, água, das plantas e mesmo dos animais, incluindo humanos. Fatores tais como: a habilidade de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos como fontes de carbono, a excepcional habilidade de colonizar nichos ecológicos diversos, nos quais a oferta de nutrientes é limitada, e a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos contribuem para as características ubiquitárias apresentadas por este microrganismo (Gales et al. 2001).

Raramente a *P. aeruginosa* se torna causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, entretanto, essa espécie bacteriana assume importante papel como agente etiológico de infecções hospitalares. Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum tipo de alteração ou destruição de barreiras físicas entre as quais se evidenciam a utilização de cateter urinário, sonda oro-traqueal, realização de cirurgias, pacientes que sofreram queimaduras e pacientes que fazem uso de drogas imunossupressoras (Lee et al. 1999). Além disso, outros fatores de risco para a aquisição de infecções causadas por *P. aeruginosa* são: idade avançada, *diabete melito*, hospitalização prolongada e o uso prévio de antimicrobianos. Sua baixa necessidade de nutrientes para o crescimento, sua tolerância a uma

série de condições físicas adversas e sua resistência a agentes antimicrobianos contribuem para o sucesso ecológico e para o importante papel como um patógeno oportunista (Carmeli et al. 1999a).

Em estudo multicêntrico (de prevalência) realizado em 22 hospitais da Turquia em 2001, foram analisados 56 Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo diagnosticados 236 casos de IH relatados. Um total de 115 pacientes (48,7%) apresentou um ou mais episódios de infecções nosocomiais. Os sítios mais freqüentes foram o trato respiratório inferior (28,0%), corrente sangüínea (23,3%) e trato urinário (15,7%). O agente etiológico mais frequentemente isolado foi a *P. aeruginosa* em 31 (20,8%) casos (Esen & Leblebicioglu 2004).

No Brasil, segundo dados do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência aos Antimicrobianos, a *P. aeruginosa* foi a causa mais freqüente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais freqüente de infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica e o sexto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea no período de 1997 a 2001 (Sader et al. 2004).

No ano de 2003, numa pesquisa realizada em um hospital público da cidade de São Paulo, envolvendo 19 UTIs, identificou-se 126 casos de IH, sendo a *P. aeruginosa* responsável por 26,4% das infecções (Toufen et al. 2003).

Moura et al (2006) ao analisarem 647 pacientes internados na UTI de um hospital público da cidade de Teresina/Piauí, detectaram que dos 394 pacientes com infecção hospitalar, 24,3% apresentaram contaminação por *P. aeruginosa*.

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pela *P. aeruginosa* são limitadas e incluem penicilinas com atividade antipseudomonas, cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam, carbapenens e fluoroquinolonas, particularmente a ciprofloxacina (Carmelli et al. 1999a). Os aminoglicosídeos são freqüentemente utilizados em regimes combinados aos β -lactâmicos na tentativa de potencializar a atividade antimicrobiana e de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, sendo a monoterapia com esse agente raramente utilizada.

Além da *P. aeruginosa* ser intrinsecamente resistente a diversos agentes antimicrobianos comumente utilizados, esse microrganismo é

altamente adaptável às condições adversas, desenvolvendo resistência durante a terapia. O risco da emergência de resistência parece variar de acordo com o agente antimicrobiano utilizado, e evidências mostram que a terapia combinada pode reduzir o risco de falha terapêutica devido à seleção de mutantes resistentes (Carmeli et al. 1999b).

2.7 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS GRAM – POSITIVOS

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, agrupadas em massas irregulares em forma de "cachos". Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas. Multiplicam-se em temperaturas de sete a 48°C, sendo de 30 a 37°C a temperatura ideal de crescimento (Kloos & Schleifer 1986, Kloos & Bannerman 1999).

O gênero *Staphylococcus* é composto de 41 espécies e 24 subespécies (Euzéby 1997). Certas espécies como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdenensis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* são agentes de diferentes infecções humanas e animais (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/DSMZ 2009).

Os *Staphylococcus* estão amplamente distribuídos na natureza e, apesar de serem encontrados predominantemente na pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves, também podem ser encontrados em outros sítios como na boca, glândulas mamárias e trato intestinal, genito-urinário e respiratório destes indivíduos (Kloos & Bannerman 1999).

Freqüentemente os *Staphylococcus* estabelecem relações simbióticas com seus hospedeiros, porém, se as barreiras cutâneas e mucosas forem rompidas, estas bactérias podem comportar-se como oportunistas (Kloos & Bannerman 1999). Apesar de muitas espécies serem consideradas saprófitas em várias regiões do corpo, o *S. aureus* é um dos principais patógenos da espécie humana (Jablonski & Bohach 1997).

O principal reservatório de *Staphylococcus* envolvidos em doenças humanas é o próprio homem. *S. aureus* é a espécie mais importante do

gênero, sendo causa significativa de infecção nosocomial tanto quanto de doenças adquiridas na comunidade. O espectro das infecções estafilocócicas varia desde pústulas e furúnculos até a síndrome do choque tóxico e sepse (Vanderlinde et al. 1999, Le Loir et al. 2003).

O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais freqüentes, responsável por surtos de DTA. As peculiaridades do seu “habitat” tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores (Oliveira et al. 2003), na maioria dos casos por portadores, mas também por animais, principalmente, gado leiteiro com mastites, que apresentam altas contagens do microrganismo no leite cru (Sommerhäuser et al. 2003).

A DTA provocada por este microrganismo é devida à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o seu aquecimento possibilitando, desta forma, a instalação de um quadro de toxinose. O agente é responsável por aproximadamente 45,0% das toxinoses alimentares no mundo, e vários trabalhos referem os manipuladores como os maiores responsáveis pela sua transmissão (Passos & Kuaye 1996, Alcaraz et al. 1997).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE), são proteínas e podem estar envolvidas em diversos tipos de infecções no homem e animais (Akineden et al. 2001, Zschöck et al. 2005). Já foram identificados 18 diferentes tipos sorológicos de SEs, designadas SEA a SEE, SEG a SER e SEU (Balaban & Rasooly 2000, Dinges et al. 2000, Alouf & Muller-Alouf 2003, Letertre et al. 2003, Mempel et al. 2003, Martín et al. 2004, Loncarevic et al. 2005, Zschöck et al. 2005). Como algumas não demonstram atividade emética ou não foram testadas ainda para esta atividade, são mais apropriadamente denominadas de proteínas tipo enterotoxinas estafilocócicas (Lina et al. 2004).

Nem todos os *Staphylococcus* produzem enterotoxinas ou a quantidade produzida pode ser insuficiente para causar toxinose alimentar (Loncarevic et al. 2005). Por outro lado, a mesma amostra de alimento pode conter diferentes isolados de *S. aureus*, portando diferentes genes para enterotoxinas. Isto demonstra a necessidade de se avaliar vários isolados a partir das placas de

isolamento, principalmente quando se tratar de casos onde sinais típicos de toxinose estafilocócica são observados (Loncarevic et al. 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas mais frequentemente identificadas a partir de amostras implicadas em casos de toxinose alimentar são SEA e SED (Balaban & Rasooly 2000, Fueyo et al. 2001, Villard et al. 2005).

A DTA por *S. aureus* requer um grande número de organismos (1×10^6 UFC/g de alimento) e 1 µg de toxina/100g de alimento é necessária para que se iniciem os sintomas clínicos. Estes aparecem dentro de uma a seis horas após a ingestão do alimento, e são caracterizados por náusea, vômito, espasmo abdominal e diarreia. Em casos severos, muco e sangue são observados no vômito e nas fezes, podendo ser fatal para recém nascidos e pessoas idosas (Raddi et al. 1988, Tranter 1990, Carmo et al. 1995).

No Estado do Rio de Janeiro, em 2000 foi relatada a ocorrência de 53 surtos que acometeram 461 pessoas, sendo que o *S. aureus* foi responsável pelo maior número de surtos (13,0%) com 8,5% dos indivíduos envolvidos (Fernandez et al. 2000).

Loguercio and Aleixo (2001), em um estudo feito com queijo Minas Frescal em Cuiabá/MT, encontraram 13 amostras consideradas como "produtos potencialmente capazes de causar doenças transmitidas por alimentos", pois apresentou contagens de *S. aureus* superior a 10 vezes o limite estabelecido nos padrões específicos.

Em 2003, Sousa e Campos, ao analisarem as condições higiênico-sanitárias de dieta enteral não evidenciaram contaminação por *S. aureus*. Em contrapartida, Martins et al (2007), encontraram 83,0% de suas amostras de dieta enteral contaminadas por este microrganismo.

Entre 1998-2008 o *S. aureus* foi responsável por 600 surtos de DTA no Brasil (Brasil 2008).

2.7.2 *Bacillus cereus*

Esta espécie apresenta células em forma de bastonetes, móveis, esporulados e anaeróbios facultativos. A maioria das espécies consiste em microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação, como *B. cereus* e *B. subtilis* (Claus & Berkeley 1986).

A DTA causada por *B. cereus* pode ocorrer quando os alimentos são preparados e armazenados sem refrigeração adequada por diversas horas antes do consumo (FDA 2008b, Schneider et al. 2006).

Os fatores de virulência do *B. cereus* estão relacionados com a produção de várias toxinas extracelulares, entre elas uma toxina diarréica termolábil que é inativada em cinco minutos a 56°C, e uma toxina termoestável de ação emética que se mantém inalterada após uma hora a 120°C (Lindback et al. 2004, FDA 2008b).

A síndrome diarréica caracteriza-se por um período de incubação que varia de oito a 16 horas e seus principais sintomas são: diarréia intensa, dores abdominais, tenesmos retais, raramente ocorrendo náuseas e vômitos. A duração da doença é de 12 a 24 horas; geralmente está associada ao consumo de alimentos de composição protéica, contaminados com aproximadamente 10^6 UFC/g de alimento (FDA 2008b).

O tipo emético de DTA pelo *B. cereus* é caracterizado por náuseas e vômitos e é semelhante aos sintomas causados por toxinose por *S. aureus*. Dores abdominais e/ou diarréia podem estar associadas a este tipo. Algumas cepas de *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram isoladas de ovinos e aves incriminados em episódios de DTA. Estes organismos produzem uma toxina altamente termoestável a qual pode ser similar à toxina do tipo emético produzida pelo *B. cereus* (Lindback et al. 2004, FDA 2008b).

Devido ao fato de ser quase impossível eliminar os esporos de *B. cereus* dos alimentos, a melhor forma de prevenir a formação da toxina é refrigerar rapidamente os produtos, em temperaturas abaixo de 8-10°C (Lund 1990, Koneman et al. 2001).

Em se tratando desse microrganismo em particular, os relatos de doenças de origem alimentar que lhe são atribuídos são escassos, com muitas ocorrências não confirmadas (Radhika et al. 2002).

No Estado de Goiás, de acordo com levantamentos realizados pelo Centro de Informações Toxicológicas de Goiás (CIT), da Superintendência de Vigilância Sanitária do Estado, foram notificados 78 casos de DTA em 1999. Em 2000, foram identificados 97 casos de toxinfecções por alimentos, sendo 10,3% destes, aproximadamente, causados por produtos cárneos (Brasil 2002).

Muniz (2005) ao avaliar a qualidade higiênico-sanitária de dietas enterais evidenciou inadequação em 25,0% das amostras que apresentaram contagens acima do limite máximo de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL.

No Estado de Minas Gerais, em 2009 foi notificada pela Secretaria de Estado de Saúde a ocorrência de dois surtos de DTAs por *B. cereus* com 61 doentes (Governo do Estado de Minas Gerais 2009).

Entre 1998-2008, *B. cereus* foi o terceiro agente mais frequente envolvido em surtos de DTAs com 205 surtos notificados (Brasil 2008).

2.7.3 *Clostridium perfringens*

O gênero *Clostridium* caracteriza-se morfológicamente por bastonetes imóveis, esporulados e anaeróbios. Possui como habitats preferenciais o solo, sedimentos de águas marinhas ou doces e o intestino de animais e do homem (Cato et al. 1986). Produzem uma enterotoxina de natureza protéica, de elevado peso molecular e sensível ao calor. Foram divididos em cinco tipos de bactérias (A, B, C, D e E) de acordo com a produção das principais toxinas letais (Sneath 1986).

C. perfringens faz parte da microbiota do solo, especialmente as cepas do tipo A, sendo também comum no conteúdo intestinal do homem e de muitos animais. Sua ampla distribuição na natureza é devida aos esporos que este microrganismo produz, altamente resistentes às condições ambientais (Steele & Wright 2001).

A toxina é formada em ambiente com pH entre 6,0 e 8,0, atividade de água entre 0,98 e 0,99 e temperatura entre 35 e 40°C. Como a toxina do *C. perfringens* forma-se durante a fase de esporulação, e esta se dá depois da ingestão do alimento contaminado, no intestino delgado, a temperatura de esporulação aproxima-se da temperatura corporal do homem (Labbe & Harmon 1992). Em geral a toxina não se forma previamente no alimento, sendo liberada *in vivo*, no intestino, e são necessárias oito a 10 mg de toxina para desencadear a doença (Labbe & Harmon 1992). O número de células necessárias para desencadear a sintomatologia e a toxinfecção acha-se compreendido entre 10^5 UFC ou mais por grama do alimento (Steele & Wright 2001).

As células vegetativas de *C. perfringens* perdem rapidamente sua viabilidade em temperaturas de congelamento, porém os esporos não demonstram a mesma sensibilidade que a forma vegetativa em baixas temperaturas (ICMSF 1980).

O *C. perfringens* é responsável por dois tipos diferentes de toxinfecção alimentar. As cepas do tipo A causam toxinfecção de forma clássica e as do tipo C causam enterite necrótica, bem mais severa. Os sintomas da toxinfecção alimentar por *C. perfringens* do tipo A são dores abdominais agudas, diarreia com náuseas e febre, mas raramente vômitos (FDA 2008c).

O primeiro relato de *C. perfringens* como agente de toxinfecção alimentar data de 1943. Desde então surtos tem sido relatados em crescente número, envolvendo grande quantidade de pessoas, tendo como locais de ocorrência escolas, hospitais e restaurantes, porém não apresenta nenhuma prevalência de sazonalidade (ICMSF 1996).

Em vários estudos realizados com dietas enterais, não foi diagnosticada contaminação por *C. perfringens* (Oliveira et al 2000, Sousa & Campos 2003, Pinto et al 2004, Lima et al 2005, Maurício et al 2005).

No Brasil, nos últimos nove anos o *C. perfringens* foi responsável por 4,9% dos surtos de DTA (Brasil 2008).

2.8 MANIPULADOR DE ALIMENTOS

A qualidade de produtos não é ao acaso, é o resultado de esforços aplicados no controle das diferentes etapas do processamento de alimentos. Os fatores tecnológicos e humanos afetam essa qualidade, no entanto, o indivíduo é o fator mais importante a ser considerado quando ocorre surtos de DTA envolvendo alimentos manipulados (Lima et al. 1998).

A WHO (1989), em seu documento, "*Métodos de vigilancia sanitaria y gestión para manipuladores de alimentos*", define que o termo "manipulador de alimentos", num sentido amplo, corresponde a qualquer indivíduo que entre em contato com um produto alimentício ou parte dele, nas etapas de produção, processamento, embalagem, armazenamento, transporte, distribuição e venda de alimentos.

A WHO (2008) relata que mais de 60,0% das DTA são provocadas por agentes microbianos, ressaltando que o manipulador é o principal veículo desta

transmissão, durante o preparo de alimentos. Tais indivíduos podem ser possíveis veiculadores sintomáticos e assintomáticos de patógenos, quando precedem à aplicação de técnicas incorretas na produção de alimentos, na higienização de equipamentos, utensílios e do próprio ambiente (Rêgo et al. 1999).

Nas etapas de preparo, os princípios de higiene pessoal têm o objetivo de garantir que aqueles que entram em contato, direta ou indiretamente, com os alimentos não venham a contaminá-los (Sgarbieri 1993). Considerando que os manipuladores de alimentos, em geral, possuem educação formal deficiente, Góes (2001) sugere que os mesmos recebam formação em higiene pessoal e de alimentos, por meio de metodologia que considere suas limitações, ressaltando a importância da educação em serviço de forma contínua e planejada. Além da importância da capacitação da mão de obra, considera-se relevante adequar os conhecimentos do manipulador ao avanço da tecnologia por meio de reciclagem do pessoal em todas as etapas de produção e, a necessidade de ações de monitoramento para efeito de controle de qualidade dos alimentos, desde a seleção da matéria prima à obtenção do produto final.

Empresas e hospitais produtores de alimentos vêm se preocupando em investir no aperfeiçoamento de técnicas que promovam o fornecimento de alimentos com qualidade higiênico-sanitária, entre elas o treinamento de manipuladores de alimentos. Considerando o grande desafio que essa atividade educativa representa, Bellizzi et al. (2005) realizaram um levantamento, entre 1994 e 2003, com o objetivo de identificar o conteúdo e as estratégias pedagógicas normalmente empregadas, bem como, as dificuldades enfrentadas na implantação de cursos, sendo estas, principalmente, o nível de escolaridade dos manipuladores de alimentos, sua indisponibilidade de horário para a realização do treinamento e a ausência do envolvimento da gerência.

Para minimizar os efeitos dos vícios de funcionários que lidam com alimentos, Germano (2003), propõe conhecer a cultura dos manipuladores; observá-los em seu cotidiano, para que os pontos fracos em relação à manipulação sejam identificados, bem como a dinâmica das relações interpessoais no serviço; conhecer as condições de trabalho e os maiores perigos em termos de segurança de alimentos para os consumidores. As ações a serem realizadas deveriam envolver também o setor administrativo da

empresa ou hospital. Isto tornaria viável a implantação do programa de treinamento, no qual disponibilidades de horário e de local para a sua realização deveriam ser respeitados.

A literatura têm demonstrado que o perfil higiênico-sanitário dos manipuladores de alimentos tem se mostrado, freqüentemente inaceitável, no que diz respeito à contaminação microbiana encontrada em diversos sítios anatômicos (Oliveira et al. 2003). Manipuladores contaminam alimentos via contato manual ou via trato respiratório através de tosse, de espirro e a contaminação geralmente ocorre após tratamento térmico do alimento (Jablonski & Bohach 1997). A presença de coliformes termotolerantes indica que houve contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene aquém dos padrões mínimos de segurança, pois um número elevado destes microrganismos evidencia falha na higienização das mãos de manipuladores, indicando grave contaminação de origem fecal (Brod et al. 2002, Maciel et al. 2002).

2.9 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

As doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados talvez sejam o problema de saúde mais difundido no mundo contemporâneo e uma das causas mais importantes da reduzida produtividade econômica de muitas nações. Apesar da natureza ubiqüitária dessas doenças, a segurança alimentar recebe menos atenção dos governos nacionais e de organizações internacionais que outras doenças mais dramáticas, porém menos globais (Baird-Parker 1994, Notermans & Borgdorff 1997, Cavalli et al 2001, WHO 2006).

A segurança alimentar é um componente vital do perfil de qualidade de um produto. Entre os atributos de qualidade dos alimentos destaca-se a chamada qualidade sanitária, inocuidade, salubridade, ou seja, os alimentos não devem causar doenças aos consumidores e nem oferecer perigo de natureza química (resíduos de pesticidas, desinfetantes, metais pesados), física (insetos, pêlos, objetos, entre outros) ou biológica (parasitas e microrganismos) (Cavali 2001, WHO 2001, 2006).

As DTA, comumente conhecidas como toxinfecções alimentares, são definidas pela WHO como “doenças infecciosas ou tóxicas causadas por

agentes que entram no organismo humano através dos alimentos e água” (Council for Agricultural Science and Technology/CAST 1994, WHO 2002, 2006).

Segundo a ANVISA (Brasil 2001) as DTA, designam as doenças causadas pela ingestão de microrganismos viáveis (infecção) ou toxinas produzidas por eles (toxinfecções) em quantidades suficientes para o desenvolvimento de quadro patológico, tendo como principal porta de entrada a via oral. A sintomatologia é caracterizada por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreia, febre e dores abdominais que ocorrem individualmente ou em combinação de sintomas.

Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais se destacam: o crescente aumento da população, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala e o deficiente controle dos órgãos públicos e privados, no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (Centro Nacional de Epidemiologia/CENEPI/ MS 2001, WHO 2002).

Segundo Ungar et al. (1992), Mead et al. (1999), Mossel et al. (1999) e Germano et al. (2000) estima-se que entre um- 100 milhões de indivíduos no mundo, contraem algum tipo de doença decorrente do consumo de alimentos e de água contaminada.

De acordo com o CDC (2001), têm sido descritas mais de 200 DTAs, como gastroenterites, diarreia dos viajantes, cólera, febre tifóide, hepatite A, hepatite E, poliomielite, toxoplasmose, verminoses, entre outras.

A situação tende a ser mais grave em países em desenvolvimento como o Brasil, nos quais condições precárias de infra-estrutura e educação sanitária facilitam a proliferação desta problemática (Mendonça et al. 2002).

Um surto de DTA é definido como a ocorrência de dois ou mais casos de uma manifestação clínica semelhante, relacionados entre si no tempo e no espaço, e caracterizados pela exposição comum a um alimento suspeito de conter microrganismos patogênicos, toxinas ou venenos. Na eventualidade particular de ocorrência de botulismo, cólera ou outra patologia grave ou inusitada, a constatação de um único caso deve ser considerada como surto (Johnston 1990, Le Loir et al. 2003).

A investigação epidemiológica de surtos de DTA tem como objetivo: coletar informações básicas necessárias ao controle do surto; identificar a população de risco; os fatores de risco associados ao surto; diagnosticar a doença e identificar os agentes etiológicos relacionados; identificar a fonte de contaminação; propor medidas de prevenção e controle pertinentes e imediatos (Costa 2006) .

Desconhece-se a verdadeira incidência e a etiologia das DTA (Buchanan & Deroever 1993, Jones & Gerber 2001), pois levantamentos mostram que menos de 0,1% desses episódios são relatados anualmente (Notermans & Borgdorff 1997). A maioria destes não é analisada sistematicamente por órgãos epidemiológicos vigentes internacionais, nacionais e regionais, uma vez que existem falhas na coleta de dados disponíveis, e a ocorrência dos casos é muitas vezes subestimada, seja por ausência de atendimento médico, diagnóstico impreciso ou não notificação pelos profissionais da saúde às autoridades sanitárias (Buchanan & Deroever 1993, Kaku et al. 1995, Livera et al. 1996, Notermans & Borgdorff 1997).

As DTA podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, entretanto, as bactérias, pela sua diversidade e patogenicidade, constituem o grupo mais importante epidemiologicamente, estando implicadas em dois terços dos surtos dessas doenças, comumente associados com alimentos de origem animal. Entre os principais agentes destas infecções encontram-se as enterobactérias, *E. coli*, *Salmonella* sp. e os principais agentes de toxinoses alimentares são: *S. aureus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* e *B. cereus* (Pan et al. 1997, Le Loir et al. 2003, Rooney et al. 2004).

Segundo Silva Jr (2005), atualmente admite-se três categorias de tais enfermidades: as toxinoses - quadro clínico conseqüente à ingestão de toxinas bacterianas pré-formadas nos alimentos, decorrente da multiplicação de bactérias toxigênicas nestes produtos; as infecções - causadas pela ingestão de células viáveis de microrganismos patogênicos que se multiplicam no trato gastrointestinal, produzindo toxinas ou agressão ao epitélio; e as toxinfecções - provocadas pela ingestão de quantidades aumentadas de bactérias na forma vegetativa que liberarão toxinas no trato gastrointestinal quando esporulam, porém sem o colonizar. Dependendo da susceptibilidade do hospedeiro, essas enfermidades podem tornar-se graves ou levar a sérias complicações crônicas.

Praticamente todos os alimentos podem atuar como veículos de agentes nocivos, causadores de doenças, porém, existem alguns que são envolvidos com maior frequência, na ocorrência de surtos (Quevedo 1984).

Embora os dados estatísticos brasileiros sejam precários, acredita-se que a incidência de doenças de origem alimentar seja grande. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de gêneros alimentícios é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos novos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos (Franco & Landgraf 2003).

Segundo Livera et al. (1996), as doenças gastrintestinais causadas por alimentos constituem um problema de saúde pública mundial, apesar de que falhas na coleta dos dados disponíveis podem subestimar a sua ocorrência, seja por ausência de atendimento médico, diagnóstico impreciso ou não notificação pelos profissionais da saúde às autoridades sanitárias. Estima-se que 12,0% das internações hospitalares brasileiras têm como causas, doenças infecciosas intestinais.

Dados do MS mostram que, no Brasil, no período de 1999-2008, ocorreram 6.062 surtos de DTAs, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos, sendo 45,2% dos casos ocorridos em residências, 19,7% em estabelecimentos de refeições coletivas (comerciais), 10,7% em instituições de ensino, 5,8% em festas e 9,1% em local ignorado. Os alimentos envolvidos nestes surtos foram: ovos (22,8%), preparações mistas (16,8%), carnes (11,7%), sobremesas (10,9%), água (8,8%), leite e derivados (7,1%) e outros alimentos (21,8%). Entre os agentes etiológicos envolvidos estavam: *Salmonella* sp. (42,9%), *S. aureus* (20,2%), *B. cereus* (6,9%), *Clostridium perfringens* (4,9%), *S. Enteritidis* (2,7%), e outros agentes (18,4%). Observa-se que os índices de microrganismos contaminantes ignorados foram bastante elevados, nesse levantamento. (Brasil 2008).

Centenas de milhões de pessoas adoecem em decorrência do consumo de produtos contaminados em todo o mundo, entretanto as conseqüências que estas doenças podem causar à saúde humana são bastante variáveis, dependendo de sua natureza, do estágio de tratamento, da idade, da

susceptibilidade do indivíduo, da patogenicidade do agente e do número de microrganismos ingeridos (Käferstein 1997, Cassin et al. 1998).

Devido à alta frequência de ocorrência, as DTAs além de causarem transtornos sanitários que afetam as pessoas, causam um impacto sócio-econômico negativo e catastrófico para as empresas ou estabelecimentos envolvidos. O comércio internacional do país pode ser afetado pela desconfiança que geram os surtos. Em caso de turismo, este pode diminuir pela desconfiança ante os alimentos oferecidos. Portanto, em muitos países a produção de alimentos seguros é uma grande preocupação e a legislação tem se desenvolvido para garantir a segurança dos mesmos (Hortua 1993, Notermans & Borgdorff 1997).

A maioria dos episódios agudos de DTAs é normalmente branda e autolimitada, sendo, como já citados os sintomas mais comuns: diarreia, cólicas, dores abdominais e náuseas, e ainda vômitos e febre, nos quadros mais severos (Archer & Kvenberg 1985, Motarjemi & Käferstein 1997).

Algumas doenças de origem alimentar podem causar seqüelas graves e crônicas para os sistemas cardiovascular, renal, digestivo, respiratório ou imune, como por exemplo, infecções por *Salmonella spp* causam artrite reativa, por *E. coli* O157:H7 podem evoluir para quadros de síndrome hemolítica urêmica (SHU), caracterizada por falência renal aguda; por *C. perfringens* desenvolvem doenças intestinais necrotizantes (Mark & Roberts 1993, Käferstein 1997, Motarjemi & Käferstein 1997).

Certos grupos populacionais, tais como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos, são considerados grupos de risco, por apresentarem o sistema imunológico incompleto ou deficiente. Esta é a razão pela qual a ingestão de um pequeno número de patógenos é suficiente para causar doença nestes indivíduos. Deve-se considerar que estas patologias podem manifestar-se de forma mais acentuada, causando sérias complicações ou até mesmo a morte (Cliver 1993, Knabel 1995, Todd 1997). Segundo Käferstein (1997), observa-se uma alta frequência de mortalidade infantil em decorrência de casos diarreicos, principalmente em países em desenvolvimento.

Novos patógenos têm sido associados como agentes de doenças de origem alimentar e desenvolvidos métodos mais eficazes de detecção e isolamento. Mudanças demográficas e alterações nos hábitos alimentares têm

contribuído para modificações tecnológicas na indústria com relação à formulação, ao processamento e à distribuição dos alimentos. Essas modificações, associadas à habilidade dos microrganismos de desenvolvimento rápido e de adaptação no meio ambiente, têm acarretado novos desafios ao sistema alimentar (Knabel 1995, Smith & Fratamico 1995).

A variedade de alimentos associados a surtos de DTAs inclui os produtos de origem animal, tais como carnes vermelhas, frango, peixes e frutos do mar, ovos, derivados de leite, e os de origem vegetal, como as frutas e vegetais (Bean & Griffin 1990, CAST 1994).

Os produtos de origem animal são fontes primárias de várias bactérias e um dos maiores veiculadores de contaminação, pois passam por muitas etapas durante sua preparação, conservação e distribuição, podendo alterar a sua microbiota natural, inclusive no processo de cocção, onde se utiliza outros produtos, que por sua vez também possuem individualmente uma microbiota específica (Roberts 1990, Moreno et al. 1996, WHO 2006, Roberts & Lyman 2008).

2.10 FATORES QUE CONTRIBUEM PARA A OCORRÊNCIA DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

O processamento de alimentos para comercialização deve obedecer a critérios que garantam qualidade, visando, como produto final, alimentos “seguros”. A qualidade é um ponto fundamental para a segurança alimentar, considerando seus valores nutricional, higiênico, biológico e tecnológico, assim como a ausência de produtos nocivos à saúde como agrotóxicos, hormônios, aditivos e outros (Valente 1997).

De acordo com a Portaria 710/99 do MS (Brasil 1999), a Segurança Alimentar, que anteriormente mantinha o conceito que se limitava ao abastecimento na quantidade apropriada, foi ampliado incorporando também o acesso universal aos alimentos, os aspectos nutricionais e conseqüentemente, as questões relativas à composição, à qualidade e ao aproveitamento biológico.

A pesquisa de matérias estranhas, macroscópicas e microscópicas, para a verificação de ácaros, fragmentos de insetos, insetos, larvas, parasitas, fezes e pêlos de animais, entre outros, é parâmetro para orientar medidas

sanitárias preventivas e corretivas em todo o processo produtivo, podendo dessa forma ser utilizado no monitoramento da elaboração de produtos artesanais. Nestes alimentos, no entanto, podem ocorrer falhas que interferem na qualidade, geralmente associadas à falhas de processamento/manipulação, falta de esclarecimento dos produtores quanto a aspectos sanitários, embalagens nem sempre adequadas e até problemas básicos de rotulagem (Souza et al. 2003). Neste contexto, diferentes aspectos devem ser considerados, incluindo a procedência da água para a limpeza dos utensílios e para preparação dos alimentos, os cuidados adotados nos núcleos de preparo dos alimentos, a forma de conservação, proteção contra vetores e o modo como são descartados os resíduos sólidos e líquidos resultantes da atividade (Huamán 1996, Garcia-Cruz et al. 2000).

Com o desenvolvimento das análises epidemiológicas e aperfeiçoamento da vigilância de DTAs e dos fatores específicos que contribuem para sua ocorrência, têm sido identificados com maior acuracidade falhas nas práticas, procedimentos e processos de fabricação. Os fatores que contribuem para a ocorrência dessas doenças refletem os perigos aos quais, a população está exposta ao ingerir um alimento, e avaliando a gravidade desses perigos, são instituídos os pontos críticos de controle, onde são estabelecidas operações e medidas que irão eliminar ou reduzir os riscos que os perigos oferecem de causar doenças, além de indicar também, onde a verificação e o monitoramento dos pontos críticos de controle são necessários (Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas/ABERC 1999).

A ocorrência de DTA depende do tipo, número e grau de virulência das cepas de microrganismos ingeridas nos alimentos e da resposta imunológica do indivíduo, evidenciando-se que estas doenças não decorrem de uma falha isolada, mas de um conjunto de fatores inadequados necessários (Knabel et al. 1995, Cassin et al. 1998).

Vários estudos realizados demonstram que os fatores que mais freqüentemente contribuem para os surtos de DTA são: resfriamento inadequado, 56,0%; o grande intervalo de tempo entre o preparo e o consumo do alimento, 31,0%; manipuladores colonizados - sintomáticos ou não, 24,0%; reaquecimento inadequado, 20,0%; processamento térmico inadequado, 16,0%; alimentos/ingredientes contaminados, 9,0%; obtenção de alimentos de

fontes inseguras, 6,0%; higienização deficiente de utensílios e equipamentos, 9,0%; contaminações cruzadas (Bryan 1984, Silva Jr 2005, WHO 2006).

De acordo com Silva Jr (2005) e WHO (2006), os manipuladores de alimentos também são responsáveis pela deposição de microrganismos sobre os alimentos e equipamentos. Utensílios de cozinha como liquidificadores, talheres, recipientes e panos de limpeza são também elementos responsáveis pela veiculação de patógenos causadores de toxinfecções. Assim sendo, torna-se extremamente necessária a limpeza e a desinfecção destes materiais que entram em contato com os alimentos “in natura”, pois alimentos crus e equipamentos contaminados, utilizados simultaneamente, e no mesmo ambiente de trabalho, podem contaminar alimentos cozidos (Bryan 1984, Ungar et al. 1992, Felipe et al. 1995).

Portanto, necessita-se intensificar o trabalho de conscientização dos manipuladores e consumidores com relação aos fatores de risco que comprometem a segurança e a qualidade dos alimentos (Altekruse et al. 1996)

Mead et al. (1997) estimaram que a lavagem correta das mãos pode evitar cerca de 34,0% das infecções causadas por *E. coli* O157:H7, Almeida et al. (1995) observaram reduções da contagem de mesófilos e ausência de *S. aureus* e *C. perfringens* após lavagem das mãos de manipuladores com água e sabonete líquido seguida da anti-sepsia com iodóforo. Altekruse et al. (1996) calcularam uma menor ocorrência de doenças de origem alimentar se houver a prevenção de contaminação cruzada e o consumo de alimentos adequadamente cozidos.

O monitoramento do tempo e da temperatura indica se haverá sobrevivência ou morte dos microrganismos durante a cocção e o reaquecimento, e quais os riscos de multiplicação durante o armazenamento e a exposição dos alimentos (Bryan 1984, Todd 1997).

Conforme Silva Jr (2005) o risco de toxinfecções através de alimentos está diretamente relacionado ao tempo decorrido entre o preparo e o consumo, podendo ser mínima ou ausente, caso os mesmos forem consumidos imediatamente após o preparo (Roberts 1990), do contrário, a manutenção prolongada desses produtos em recipientes abertos a temperatura ambiente favorece a proliferação microbiana (Razem & Razem 1994).

2.11 EPIDEMIOLOGIA

A epidemiologia busca identificar fatores que levam à distribuição de doenças em determinado período de tempo e espaço geográfico assim como os fatores que estabelecem a transmissão, manifestação e progressão de enfermidades. Além disso, a epidemiologia é sempre motivada pela oportunidade e possibilidade de ações de intervenção e de prevenção (Rouquayrol & Filho 2003).

Estudos epidemiológicos buscam estabelecer a fonte de microrganismos para alimentos, utilizando técnicas de tipificação bacteriana, podendo caracterizar microrganismos isolados de possíveis fontes (animais, manipulador, equipamentos e outros fômites) e compará-los fenotipo e genotipicamente com os isolados dos alimentos. Estes estudos, há mais de duas décadas, têm sido considerados uma sub-especialidade da Epidemiologia compondo a chamada “Epidemiologia Molecular”. Considerando a definição desses dois termos, esta última compreenderia o emprego de técnicas de biologia molecular ao estudo de distribuição e ocorrência de marcadores de doenças em uma população (Foxman & Riley 2001) e, suas aplicações práticas incluiriam a identificação de microrganismos responsáveis por doenças infecciosas e determinação de sua fonte, as relações biológicas, os mecanismos de transmissão e os genes responsáveis por virulência, antigenicidade e resistência a drogas (Levin et al. 1999).

Técnicas moleculares podem ser aplicadas na mensuração dos fatores ligados ao hospedeiro e ao agente. Quando aplicadas em estudos de doenças, os resultados aumentam a habilidade de detectar associações de forma mais confiável. Tais estratégias ajudam a estratificar e refinar dados proporcionando mensurações mais sensíveis e específicas, as quais facilitam atividades epidemiológicas incluindo vigilância, investigações de surtos, identificação de modelos de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente desconexos, caracterizando interações hospedeiro–patógeno, detectando organismos não cultiváveis e promovendo melhor entendimento da patogênese das doenças, em nível molecular (Foxman & Riley 2001).

Os surtos de doenças infecciosas, entre elas as DTAs, freqüentemente resultam de uma exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Geralmente, este agente é derivado de uma única célula onde sua progênie é

geneticamente idêntica ou fortemente relacionada ao microrganismo fonte. Em termos epidemiológicos os microrganismos envolvidos no surto são clonalmente relacionados, ou seja, tem origem comum. Tais organismos compartilham fatores de virulência, traços bioquímicos, características genômicas. Entretanto, existe heterogeneidade suficiente em nível de espécies, que organismos isolados de diversas fontes em diferente período de tempo e em diferentes regiões geográficas podem ser classificados em subtipos ou cepas. O processo de subtipificação é importante epidemiologicamente para reconhecer surtos, detectar a transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, determinar fonte de infecção, reconhecer particularmente cepas virulentas e monitorar programas de intervenção (Olive & Bean 1999).

Há algum tempo têm-se evidenciado que existem significantes variações na incidência e gravidade de doenças causadas por microrganismos classificados como membros da mesma espécie. Como resultado da compreensão das bases microbiológicas destas variações e classificando as espécies mais rigorosamente, foi desenvolvida uma variedade de esquemas de tipificação através de marcadores sorológicos e fenotípicos. Esses estudos revelam que as linhagens bacterianas conservam sua integridade genética por longos intervalos de tempo e distâncias, ou seja, seus genomas não são facilmente desorganizados ou reorganizados por mutações e recombinações recorrentes. Esta visão de estrutura genética de populações bacterianas é conhecida como “conceito de clone” (Levin et al. 1999).

Gerações de microbiologistas têm observado que isolados da mesma espécie não relacionados epidemiologicamente, sempre diferem em múltiplas características. Sistemas de tipificação se baseiam na premissa que isolados clonalmente relacionados podem apresentar características pelas quais podem ser diferenciados de isolados não relacionados (Arbeit 1999).

A caracterização de microrganismos por tipificação molecular proporcionando evidências de relações genéticas tem sido freqüentemente utilizada por microbiologistas e epidemiologistas em estudos de doenças infecciosas. A necessidade em estabelecer essas relações pode surgir durante uma investigação de surtos nos quais organismos identificados como da mesma espécie e similar perfil de resistência a antimicrobianos, determinam a disseminação clonal da doença dentro de um micro ambiente bem como a

fonte de infecção. Assim a vigilância epidemiológica requer monitoramento da distribuição clonal e determinação da prevalência de cepas dentro de uma população com o objetivo de controlar a emergência e disseminação de patógenos específicos (Tosin et al. 2003).

2.12 TIPIFICAÇÃO MICROBIANA

Sistemas de tipificação são usados na discriminação de isolados não relacionados epidemiologicamente pertencentes à mesma espécie microbiana baseando-se em características fenotípicas e genotípicas chamadas de marcadores epidemiológicos. Também são utilizados para reconhecer fortes relações de isolados derivados de um mesmo surto ou cadeia de transmissão, refletindo o fato de que eles são descendentes de uma única célula (Struelens 1996).

Existem diversidades genéticas substanciais dentro de espécies microbianas e os isolados são tipicamente distribuídos entre muitas linhagens geneticamente diferentes. Estas divergências evolucionárias refletem a ocorrência de mutações ao acaso, não letais, incluindo substituições de pares de bases, deleção de genes individuais ou aquisição de DNA de outras espécies. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares altamente sensíveis, alterações sutis no genoma podem ser precisamente detectadas (Arbeit 1999).

Sistemas de tipificação são usados para definir características do objeto de estudo. Os procedimentos são específicos para diferentes parâmetros fenotípicos ou genéticos, podendo ser gerais, ou seja, aplicáveis a qualquer espécie microbiana, ou espécie e/ou gênero específicos. É também recomendável que os procedimentos sejam acessíveis, ou seja, de fácil execução e de custos não elevados (van Belkum et al. 2001).

Segundo Arbeit (1999) não existe nenhuma técnica padrão ouro pela qual se julgue um método de tipificação ou que consistentemente forneça resultados verdadeiramente positivos ou negativos. Conseqüentemente, os resultados de sistemas de tipificação devem ser considerados em relação aos dados epidemiológicos juntamente com outros parâmetros.

Os sistemas de tipificação podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório, facilidade de execução e

interpretação. A tipabilidade se refere à habilidade em obter resultados não ambíguos para os isolados analisados; a reprodutibilidade se refere à habilidade da técnica em obter resultados idênticos quando a mesma cepa é testada repetidamente; e, o poder discriminatório se refere à habilidade em diferenciar cepas não relacionadas epidemiologicamente (Tenover et al. 1997, Olive & Bean 1999).

Técnicas mais frequentemente aplicadas são aquelas mediadas por ácidos nucleicos, sendo assim mais recomendadas do que procedimentos orientados por características fenotípicas em estudos de taxonomia, epidemiologia e evolucionários. Vários métodos para determinação de variações genéticas entre isolados microbianos têm sido descritos, cada um com limitações dependentes de alvos no ácido nucleico, que devem ser consideradas quando são realizados estudos de tipificação molecular e subseqüentemente cálculo das relações entre cepas. O método a ser utilizado deve ser determinado pela natureza das questões a serem respondidas (van Belkum et al. 2001).

A habilidade em utilizar métodos de tipificação molecular para acompanhar a disseminação geográfica de clones específicos vem proporcionar novas informações e oferecer oportunidades para elucidar aspectos epidemiológicos e de patogenicidade microbiana (Tosin et al. 2003).

Resumidamente, os métodos de tipificação epidemiológica são aplicados em estudos de genética de populações bacterianas, patogênese e história natural de infecções, vigilância epidemiológica de doenças infecciosas e investigação de surtos, fornecendo assim, informações importantes quanto à extensão de disseminação epidêmica de clones microbianos na população exposta, número de clones envolvidos na transmissão e infecção, identificação de fonte de contaminação e veículos de transmissão, identificação e monitoramento de reservatórios de clones epidêmicos na população e/ou ambiente e na avaliação da eficácia de medidas de controle adotadas na contenção ou interrupção de disseminação de clones epidêmicos (Struelens 1996).

2.12.1 Técnicas de tipificação microbiana

Os métodos de tipificação podem ser classificados em técnicas fenotípicas, que detectam características expressas pelos microrganismos e técnicas genotípicas, que envolvem análise baseada diretamente no DNA cromossômico ou de elementos genéticos extracromossômicos (Arbeit 1999).

Técnicas fenotípicas são aquelas que caracterizam os produtos de expressão de genes para diferenciar cepas. São limitadas pela capacidade dos microrganismos em alterar a expressão de genes, pois essas propriedades tendem a variar em função das trocas nas condições de crescimento e na fase de crescimento além de mutações espontâneas que podem resultar em regulação anormal ou alteração funcional do gene responsável por um fenótipo determinado. Assim, isolados da mesma espécie e geneticamente indistinguíveis, podem apresentar fenótipo variado. Outra limitação dessas técnicas é que o material disponível pode não ser apropriado para todas as cepas e grande parte destas podem apresentar fenótipo nulo e serem conseqüentemente não tipificáveis (Tenover et al. 1997, Arbeit 1999).

Entre as técnicas fenotípicas mais comuns estão: biotipificação que se refere ao padrão de atividades metabólicas expressas por um isolado incluindo reações bioquímicas, morfologia de colônias e tolerância ambiental; teste de susceptibilidade a antimicrobianos; sorotipificação que se baseia nas diferenças de determinantes antigênicos expressos na superfície celular dentro da mesma espécie; fagotipificação que determina a susceptibilidade ou resistência das cepas isoladas à lise por bacteriófagos (vírus que parasitam bactérias) padrões; e, eletroforese enzimática (MLEE - *multilocus enzyme electrophoresis*) onde os isolados são analisados pela diferente mobilidade eletroforética de determinadas enzimas metabólicas expressas ou produzidas (Arbeit 1999).

Falhas associadas às análises fenotípicas levaram ao desenvolvimento de métodos de tipificação baseados no genótipo microbiano ou na seqüência de DNA. Tais técnicas minimizam problemas com tipabilidade e reprodutibilidade e em alguns casos, permitem o estabelecimento de base de dados para caracterização de organismos, tendo-se revelado como preferenciais para tipificação de cepas dos patógenos bacterianos mais

comuns, tanto em laboratórios clínicos quanto de referência (Maslow et al. 1993).

Com a disseminação de ferramentas para análise de DNA, quase todas as técnicas envolvendo esta análise têm sido aplicadas à tipificação de cepas, porém, nenhuma delas combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade, além da complexidade na interpretação de resultados e aplicação efetiva a estudos epidemiológicos (Arbeit 1999).

Nos últimos anos técnicas moleculares têm emergido como métodos de escolha na tipificação genotípica de isolados microbianos sendo: análise plasmidial – sofre as limitações inerentes ao fato dos plasmídios serem móveis e extracromossomais, portanto, não fazem parte do genótipo cromossomal que define as cepas, podendo ser perdidos ou adquiridos por uma cepa e conseqüentemente, isolados epidemiologicamente relacionados podem apresentar perfis plasmidiais diferentes; análise por enzimas de restrição (REA de DNA cromossomal) que se baseia no tratamento do DNA por endonucleases que possuem vários sítios de restrição gerando inúmeros fragmentos que podem ser separados e observados por eletroforese em gel de agarose; *southern blot* que detecta somente o fragmento de restrição associado a um *locus* cromossomal específico se baseando na digestão do DNA bacteriano, separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose e transferência (*blotting*) dos fragmentos para uma membrana de nitrocelulose ou nylon onde os fragmentos contendo seqüências específicas são detectados usando-se sonda marcada; ribotipificação que se refere a uma análise *southern blot* onde as cepas são caracterizadas por RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*) associadas à operon(s) ribossomal (is); eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) que consiste na digestão do DNA por enzimas de restrição que resultam em cinco a 20 fragmentos relativamente grandes que são observados depois da corrida em gel de agarose em campo elétrico cuja orientação é mudada periodicamente (pulsada); sistema de tipificação aplicando PCR (AP-PCR - *arbitrarily primed PCR*) que é a reação em cadeia da polimerase utilizando primers inespecíficos, consistindo na utilização de pequenos primers cuja seqüência não é específica para genes (Maslow et al 1993, Tenover et al. 1997, Arbeit 1999).

2.12.1.1 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos – Antibiograma

Testes de susceptibilidade a agentes antimicrobianos, incluindo drogas e outras substâncias químicas, podem ser realizados tanto com métodos de difusão como diluição. Os parâmetros de resistência biologicamente definidos para a detecção de determinantes de resistência adquirida podem não coincidir com aqueles empregados nos laboratórios de microbiologia clínica. Entretanto, concentração inibitória mínima ou análises quantitativas de tamanho de zona de inibição de crescimento são mais informativas do que modelos de resistência qualitativa. A tipificação por antibiograma pode, com uma relevante seleção de marcadores, ser aplicada à maioria das espécies microbianas. A discriminação é dependente da diversidade e da prevalência relativa de mecanismos de resistência adquirida detectável no estudo dos isolados. A estabilidade do modelo de resistência pode ser insuficiente para o seu uso como um marcador clonal, especialmente se determinantes de resistência são originados de plasmídios ou expressos sob controle de sistemas regulatórios complexos. O antibiograma é um dos mais valiosos métodos de triagem em laboratório clínico pela facilidade de uso e interpretação além de ser tecnicamente simples, de baixo custo e apropriado para um grande número de isolados (Struelens 1996).

Laboratórios de microbiologia clínica rotineiramente determinam a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados. Tanto métodos manuais quanto automatizados são largamente disponíveis, rigorosamente controlados quanto à qualidade, de fácil utilização e de baixo custo. Esses dados são disponíveis a clínicos e médicos infectologistas. A identificação de um novo ou não usual modelo de resistência a antibiótico entre isolados cultivados de múltiplos pacientes é freqüentemente a primeira indicação de um surto (Arbeit 1999).

Em estudos epidemiológicos detalhados, tais testes apresentam limitação de uso, pois apresentam baixo poder discriminatório uma vez que a resistência antimicrobiana está sob pressão seletiva em hospitais e outros centros de tratamento além de estar freqüentemente associada com elementos genéticos móveis. Alterações no antibiograma podem refletir variação fenotípica, assim, isolados que são epidemiologicamente relacionados e geneticamente indistinguíveis podem manifestar diferentes perfis de

susceptibilidade aos antimicrobianos pela aquisição de novo material genético, com o tempo ou com perda de plasmídeo (Tenover et al. 1997).

Existem diferentes mecanismos genéticos pelos quais um isolado pode tornar-se abruptamente resistente a um particular antibiótico. Isto inclui mutações pontuais espontâneas e aquisição de genes de resistência específica via plasmídios e transposons de outras cepas ou mesmo de outras espécies. Mesmo um simples plasmídeo ou um transposon composto podem carregar vários elementos de resistência, assim a resistência a múltiplos agentes antimicrobianos pode ser adquirida simultaneamente. Por outro lado, na ausência de pressão seletiva, tais elementos podem ser perdidos. Como consequência destes vários mecanismos genéticos, diferentes cepas podem desenvolver modelos de resistência similares e, por outro lado, modelos de susceptibilidade de isolados clínicos sequenciais representando a mesma cepa podem diferir para um ou mais antibióticos (Maslow et al. 1993, Arbeit 1999).

Entretanto, os testes de resistência a antimicrobianos podem ser muito úteis como triagem inicial para estudos de correlação de cepas de microrganismos em surtos de DTA, podendo ser complementados com métodos de tipificação genotípica (Tenover et al. 1997, Arbeit 1999).

Nas últimas décadas, muitos métodos têm sido aplicados para comparar cepas de microrganismos na tentativa de identificar os mecanismos de transmissão e fontes de contaminação (Zadoks et al. 2002). Entre as técnicas fenotípicas utilizadas, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos tem sido especialmente usado devido a seu baixo custo, facilidade de execução, além de contribuir para informar sobre a resistência dos microrganismos a antimicrobianos (Kluytmans et al. 1995, Acco et al. 2003).

A alta incidência de resistência a drogas pode ser atribuída à ampla utilização de antibióticos no tratamento da população humana e animal. O uso indiscriminado de substâncias antibióticas associadas a não observância do período de carência destas drogas leva a uma seleção de cepas. Esta resistência pode comprometer o efeito da antibioticoterapia utilizada em infecções humanas ou em animais causadas por microrganismos (Valquez-Moreno 1990). Como consequência, a emergência de bactérias multi-resistentes a antibióticos tem se constituído no maior desafio no tratamento de

doenças infecciosas, fato este que demanda a identificação e controle das fontes de contaminação e dos mecanismos de transmissão (Goñi et al. 2004).

A ocorrência de cepas, consideradas selvagens, resistentes aos antibióticos é fato preocupante, quando observadas as características de patogenicidade da bactéria em questão e a possibilidade de infecções extra-intestinais, decorrentes de gastroenterites em grupos mais sensíveis da população, como as crianças, idosos e imunocomprometidos (Varnan & Evans 1991).

Vários estudos têm mostrado um crescente isolamento de bactérias resistentes a antimicrobianos, fenômeno que vem despertando grande interesse entre os pesquisadores. Tais relatos citam o aparecimento de cepas resistentes a diversas drogas, tais como gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, amicacina e sulfametrina sulfadiazina trimetoprima, inclusive com a ocorrência de cepas multiresistentes a dois ou mais desses antibióticos de importância terapêutica (Lázaro 1994).

A tipificação pelo antibiograma apresenta como principal desvantagem a variabilidade da expressão da resistência que também é susceptível à instabilidade devido à transmissão horizontal e perda dos elementos genéticos extracromossômicos (Montesinos et al. 2002). O antibiograma ainda é válido como primeira aproximação da origem clonal ao comparar dois isolados bacterianos, especialmente em laboratórios de rotina (Hoefnagels-Schuermans et al. 1997). Para uma boa aproximação sempre se deve considerar a epidemiologia do microrganismo, a genética bacteriana, os perfis de susceptibilidade habituais e os mecanismos moleculares de resistência. Finalmente é importante saber identificar no perfil de susceptibilidade, um bom marcador que permita aproximar-se à clonalidade entre isolamentos bacterianos (Labarca 2002).

2.12.1.2 *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Desenvolvido por Schwartz e Cantor (1984), como uma ferramenta para examinar o DNA cromossomal de organismos eucarióticos, PFGE é uma variação da eletroforese em gel de agarose, na qual a orientação do campo elétrico que atravessa o gel é modificada periodicamente (pulsos). Embora recente, a caracterização de grandes fragmentos de DNA foi limitada por dois

fatores, primeiro, os fragmentos de DNA igual ou maior a 25 kb não são ou são dificilmente separados pela eletroforese em gel de agarose convencional, e segundo, o DNA preparado em solução é quebrado espontaneamente em fragmentos iguais ou menores que 100 kb. Por razões técnicas, essa modificação crítica permite que os grandes fragmentos de DNA sejam separados eficientemente pelo tamanho. Neste método o DNA inteiro é obtido a partir da incorporação de células microbianas intactas em blocos (*plugs*) de agarose onde ocorre a lise enzimática da parede celular e a digestão de proteínas celulares. O genoma bacteriano, que tipicamente possui o tamanho de 2.000 a 5.000 kb é digerido por uma endonuclease específica que apresenta poucos sítios de restrição e assim gera aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição de aproximadamente de 10 a 800 kb (Tenover et al. 1997).

Numa câmara se posiciona o gel de agarose entre três grupos de eletrodos formando um hexágono em volta do gel. Ao invés de aplicar uma corrente elétrica no gel em uma única direção, como é feito em eletroforese convencional, neste método a corrente é aplicada primeiramente numa direção de um grupo de eletrodos que depois é transferida ao segundo grupo de eletrodos por um curto período de tempo (um pulso) e em seguida para o terceiro grupo de eletrodos. Assim o campo elétrico que leva o DNA a migrar no gel é proporcionado em pulsos que alterna nos três grupos de eletrodos. Isto leva o DNA a agitar através do gel e o movimento de cá para lá resulta em um alto nível de resolução do fragmento. A eletroforese destes fragmentos permite a visualização do perfil de restrição, que compreende uma série de bandas com tamanhos diferentes separadas efetivamente no campo pulsado. A relação entre os isolados bacterianos é inferida pela similaridade dos perfis de restrição originados (Arbeit 1999, Singer et al. 2004).

A maior dificuldade associada ao PFGE seria a demanda técnica do procedimento e o custo inicial do equipamento eletroforético assim como os softwares especializados para análise. Entretanto, a interpretação dos resultados de PFGE é relativamente simples e guias consensuais para correlação de variações nos perfis de restrição com relações epidemiológicas já foram publicados (Tenover et al. 1997, Senna et al. 2002).

Este método requer interpretação subjetiva e comparação dos perfis de restrição e imagens (Singer et al. 2004). A utilização de programas

computadorizados para comparação de perfis tem aprimorado a interpretação dos resultados obtidos por PFGE (Shopsin & Kreiswirth 2001).

O principal objetivo da tipificação molecular de cepas é definir relações genotípicas entre grupos de isolados e assim inferir relações epidemiológicas. Todos isolados bacterianos são, teoricamente, tipificáveis pelo PFGE com resultados altamente reprodutíveis. A simplicidade relativa dos perfis de restrição facilita grandemente a análise e comparação de múltiplos isolados. Esta técnica é altamente discriminatória e reprodutível com desempenho comparável ou superior a outras técnicas disponíveis e tem sido aplicada com sucesso à tipificação de um grande número de microrganismos gram-negativos, gram-positivos e espécies de micobactérias (Matushek et al. 1996, Blanc et al. 2001, Bidet et al. 2005).

A taxa de mutação, incluindo mutações pontuais, rearranjos genéticos e transferência horizontal de elementos móveis como fagos e transposons, é diferente entre as diferentes espécies bacterianas. Em um sistema de tipificação, essas mutações influenciam diretamente a estabilidade dos padrões tipificáveis durante os ciclos de replicação de um dado clone bacteriano. Assim para um determinado microrganismo, a interpretação epidemiológica de padrões de PFGE vai depender das escalas de tempo e espaço considerados (Blanc et al. 2001, Singer et al. 2004).

PFGE é um método de referência para tipificação da maioria dos patógenos nosocomiais, sendo uma ferramenta muito útil para complementar as análises epidemiológicas de surtos.

3 JUSTIFICATIVA

No Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Goiás (UFG) bem como no Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO), tem-se observado os avanços que a Terapia de Nutrição Enteral vem conquistando face aos resultados positivos no tratamento de pacientes debilitados. Nestes serviços tem ocorrido o aumento o uso desta terapia, o que representa 15,0% dos pacientes em relação ao total submetido a algum tipo de tratamento dietoterápico especializado que não seja via sonda enteral.

Diante da responsabilidade que o profissional nutricionista depara com o uso deste tratamento, tornou-se importante a preocupação não só com a qualidade nutricional, mas também com a qualidade higiênico-sanitária em relação às formulações oferecidas, visto que os riscos de contaminação são significativos podendo gerar sérios prejuízos na recuperação da saúde dos pacientes.

Sendo assim, observa-se a necessidade de se intensificar as pesquisas na área de controle de qualidade higiênico-sanitário de dietas enterais principalmente no âmbito nacional, pois se trata de um recurso dietoterápico em plena expansão ao tratamento de pacientes, na maioria, debilitados, os quais não podem se submeter aos riscos que uma dieta contaminada poderia ocasionar.

Para a caracterização de cepas de microrganismos, recomenda-se a associação de técnicas fenotípicas e genotípicas (tradicionais e moleculares). Com isto aumenta-se a sensibilidade e o poder discriminatório das técnicas, possibilitando a obtenção de resultados mais consistentes, com maior sensibilidade e poder discriminatório.

Em virtude do crescente aumento do uso de NE e sua importância como método terapêutico e, diante da constatação de que dietas contaminadas podem atuar como etiologia de infecções, propôs-se o presente trabalho visando à avaliação das condições higiênico-sanitárias das dietas enterais produzidas pela Unidade de Dietas Especiais a pacientes internados no HC e HUGO.

Acredita-se que tal investigação, possa contribuir para a construção de orientações técnicas na implantação de programas destinados ao controle

higiênico-sanitário na produção de dietas enterais. Os resultados aqui obtidos poderão subsidiar novas atividades de pesquisa e extensão desta natureza, inclusive ações intervencionistas e preventivas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária das dietas enterais (DE), produzidas pela Unidade de Dietas Especiais do HC/UFG e HUGO, destinadas a pacientes internados nos hospitais.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Isolar e identificar microrganismos indicadores de qualidade e patogênicos (microrganismos mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli*, bolores e leveduras, *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus* e *Salmonella*) a partir do módulo em pó e dieta enteral;

4.2.2 Isolar e identificar microrganismos indicadores de qualidade e patogênicos (microrganismos mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e *P. aeruginosa*) a partir da água;

4.2.3 Isolar e identificar *E. coli* e *S. aureus* a partir de amostras de mãos e fossas nasais de manipuladores envolvidos na preparação das DE;

4.2.4 Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* e *S. aureus* isoladas das amostras coletadas;

4.2.5 Caracterizar os tipos genéticos de *E. coli* e *S. aureus* utilizando a técnica do Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE);

4.2.6 Estabelecer possíveis relações entre a cepa isolada e a fonte de contaminação do produto final (dieta enteral).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DE ESTUDO

5.1.1 Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) é uma Instituição de Ensino da área de saúde, sendo um órgão suplementar da UFG, vinculado à Reitoria e classificado como Hospital Próprio da Rede Federal, conforme Portaria nº. 111 de 23 de março de 1984 do Ministério da Educação.

O Hospital foi fundado em 23 de janeiro de 1962, com 60 leitos e 67 funcionários, com o objetivo à Assistência, Ensino, Pesquisa e Extensão (Neto 2008).

Atualmente o hospital possui 280 leitos distribuídos nas clínicas médica, cirúrgica, pediátrica, pronto socorro e UTI e conta com uma equipe multiprofissional de aproximadamente 1.800 funcionários entre médicos, enfermeiros, nutricionistas, psicólogos e fisioterapeutas.

No hospital há uma média de 25 pacientes com uso de terapia nutricional enteral por dia, sendo produzidas 125 dietas/dia e 3.750/mês.

5.1.2 Hospital de Urgências de Goiânia

O Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO), unidade de saúde pública estadual vinculada à Secretaria de Estado da Saúde, foi criado pelo Decreto 2.740, de 11 de junho de 1987 e estruturado pelo Decreto 3.522 de 19 de setembro de 1990. Em 12 de junho de 1991, a Lei Nº 11.460 alterou a nomenclatura inicial dada à Unidade para Hospital de Urgências de Goiânia Dr. Valdemiro Cruz, homenagem ao médico pediatra que deixou seu nome ligado à medicina goiana. Seus serviços foram disponibilizados à sociedade em dezembro de 1991, nas gestões do Governador de Goiás Dr. Henrique Antônio Santillo.

O Hospital compreende uma área de 28.541,60 metros quadrados, com 221 leitos de internação (inclusive para observação) e centro cirúrgico com 10 salas em funcionamento. Possui uma média total de 2.000 funcionários entre

médicos, nutricionistas, enfermeiros, psicólogos, fisioterapeutas, fonoaudiólogos e farmacêuticos (Costa 2008).

No hospital há uma média de 45 pacientes com terapia de nutrição enteral por dia, sendo produzidas 270 dietas/dia e 8.100 ao mês.

5.1.3 Unidade de Dietas Especiais

Este estudo foi conduzido na Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) do HC/UFG e do HUGO que contam com área própria destinada ao preparo de NE, chamada de Unidade de Dietas Especiais (UDE), onde, de acordo com a prescrição dietética, há um mapa específico de produção para cada uma das dietas.

A UDE utiliza na Terapia de Nutrição Enteral formulações dietéticas industrializadas líquidas prontas para o uso as quais são apenas porcionadas nos frascos de administração, dietas industrializadas em pó necessitando reconstituição hídrica ou ambas acrescidas de módulos de nutrientes (carboidratos, proteína, lipídio e/ou fibra).

Utiliza também dietas artesanais constituídas pela manipulação de alguns produtos como, módulos de nutrientes, leite em pó (desnatado ou integral), produto a base de proteína hidrolisada de soja, suplemento alimentar completo e água filtrada e fervida para a reconstituição, estando esta em fase de desuso frente às poucas vantagens oferecidas com relação ao custo-benefício.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS

- Módulo em pó industrializado: Nos dois hospitais, 50g do módulo em pó utilizado para preparação das dietas foram coletados com o auxílio de um medidor, e acondicionado em copos plásticos descartáveis fornecidos pelos hospitais.
- Água filtrada: 100 mL da água utilizada para preparação das dietas foram coletadas e acondicionadas em frasco plástico esterilizado utilizado pelos hospitais para armazenamento das dietas.
- Dietas do HC: 100 mL das amostras foram coletadas considerando somente as dietas industrializadas em pó e módulos de nutrientes em pó administradas através do sistema aberto. As dietas de cada paciente a

serem administradas no período noturno foram preparadas uma única vez, às 16:00 horas, sendo armazenadas em geladeira para uso durante a noite e manhã do dia seguinte. As amostras foram coletadas uma vez por semana, durante 40 semanas, no momento em que foram preparadas e 15 horas após, ou seja, às 16:00 horas de um dia, e às 7:00 horas do dia seguinte, perfazendo um total de duas amostras por semana e, no final do período, um total de 80 amostras.

- Dietas do HUGO: 100 mL das amostras foram coletadas considerando somente as dietas industrializadas em pó e módulos de nutrientes em pó, as quais foram administradas através do sistema aberto. As dietas de cada paciente a serem administradas foram preparadas em horários fixos (9:00 -12:00 -15:00 -18:00 e 21:00 horas) sendo fornecidas aos pacientes num período de seis horas, em temperatura ambiente. Foram coletadas uma amostra do período noturno e uma amostra do período diurno todos os dias da semana, durante um mês, no momento em que foram preparadas, às 6:00 e 9:00 e após seis horas de armazenamento em temperatura ambiente, às 12:00 e 15:00 respectivamente, perfazendo um total de 28 amostras por semana e, no final do período, um total de 80 amostras.
- Manipuladores: com *swab* esterilizado, foram coletadas amostras das fossas nasais e mãos de todos os manipuladores envolvidos na preparação das dietas no mesmo dia da coleta das dietas. Os *swabs* foram colocados em tubos individuais contendo 4 mL de Brain Heart Infusion (BHI).

Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com placa de gelo reciclável, para evitar a sua alteração devido a temperatura ambiente e, imediatamente transportadas ao laboratório em um prazo de meia hora.

5.3 LOCAL DAS ANÁLISES:

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiente do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

5.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O protocolo microbiológico incluiu as contagens de aeróbios mesófilos viáveis (Stevenson & Segner 2001), de coliformes a 35°C (FDA 2002), *Escherichia coli* (FDA 2002, Kornacki & Jonhson 2001), *Staphylococcus* coagulase positiva (Lancette & Bennett 2001), *Bacillus cereus* (Bennett & Belay 2001), *Clostridium* sulfito redutor a 46°C (Labbe 2001) e bolores e leveduras (Beuchat & Cousin 2001), a pesquisa de *Salmonella* sp. (Andrews et al. 2001) e de *Pseudomonas aeruginosa* (APHA 2005).

5.4.1 Preparo das diluições

Para o preparo das diluições decimais sucessivas foi utilizada Água Peptonada Tamponada estéril (APT) 0,1%. Inicialmente 25 mL das amostras foram adicionadas a 225 mL de APT constituindo a diluição 10^{-1} , as outras diluições (10^{-2} e 10^{-3}) foram realizadas em tubos de APT de 9 mL.

5.4.2 Contagem de Aeróbios mesófilos viáveis

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi realizada através da semeadura em placas de Petri estéreis, 1,0 mL da amostra (10^0) original e das diluições decimais selecionadas. Em seguida era adicionado 15 mL de Ágar Padrão para Contagem (APC) previamente fundido e resfriado à temperatura de 45°C e após solidificação, as placas eram incubadas em posição invertida em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas. Após o período de incubação foi feita a contagem das colônias e o resultado multiplicado pela recíproca da diluição utilizada e o resultado expresso como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ mL) de amostra (Stevenson & Segner 2001).

5.4.3 Contagem de Coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*

Foram efetuadas as enumerações de coliformes totais, em placas contendo Violet Red Bile Agar (VRBA) e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24-48 horas. Completado o período de incubação foi verificado o crescimento de colônias. As amostras positivas, com colônias rosas, foram confirmadas como coliformes a 35°C em caldo verde brilhante bile a 2,0%

lactose com incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e os coliformes termotolerantes em caldo EC com incubação a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (FDA 2002).

Para contagem de *E. coli*, a partir dos tubos de caldo EC considerados positivos, foi semeado, por estrias, em placas de Petri contendo Eosin Methylene Blue Agar (EMB). Após a semeadura as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C , por 24 horas. Completado o período de incubação foi verificada a presença de colônias lactose positivas, ou seja, colônias negras metálicas ou com o centro negro, com transparência na periferia. Então foram selecionadas colônias típicas de cada placa com Ágar EMB que apresentaram crescimento. A confirmação da presença de *E. coli* foi realizada a partir da coloração de Gram para observação de bastonetes gram-negativos, bem como as provas do IMViC: indol, VM-VP e citrato (FDA 2002, Kornacki & Jonhson 2001).

5.4.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A contagem de *S. aureus* foi realizada através da semeadura de 0,1 mL da amostra original (10^0) e das diluições em superfície de Ágar Baird-Parker (BP). Após a distribuição do inoculo com auxílio de alça de Drigalsky, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa a 37°C , por 48 horas.

Após incubação, foram contadas as colônias típicas (negras, pequenas, lisas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente) e atípicas (negras, sem halo). Colônias representativas de cada grupo (mínimo de cinco por grupo) foram repicadas em Agar nutriente inclinado e submetidas à coloração de Gram e às seguintes provas: catalase, coagulase e DNase. As colônias características de *S. aureus* (cocos gram-positivos, catalase, coagulase e DNase positivas) foram utilizadas juntamente com o fator de diluição para calcular o número de UFC da amostra (Lancette & Bennett 2001).

5.4.5 Pesquisa de *Samonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. incluiu pré-enriquecimento não seletivo de 25 mL das amostras em 225 mL de APT 1,0%. Após incubação a 37°C por 24 horas, 1,0 mL foi transferido em paralelo para enriquecimento seletivo em tubos com 10 mL de caldo Selenito Cistina e Tetracionato de Kauffmann a 42°C por 24 horas. Em seguida as amostras foram estriadas em meios seletivos: Ágar

Salmonella-Shigella (SS) e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) com incubação a 37°C por 24 horas. As cepas com características coloniais típicas foram estriadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TAF), incubado a 37°C por 24 horas e por fim, realizaram-se os testes bioquímicos (teste de uréia, citrato, VM-VP, triptona, indol, malonato, fenilalanina, lisina, lactose e sacarose) (Andrews et al. 2001).

5.4.6 Contagem de *Clostridium* sulfito redutor

Foram semeadas assepticamente, alíquotas de 1,0 mL da amostra pura e de cada diluição selecionadas em placas de Petri estéreis. Em seguida foi adicionado Ágar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS) previamente fundido e resfriado à temperatura de 45°C, com sobrecamada. Após a solidificação, as placas eram incubadas em anaerobiose em estufa a 46°C/ 24-48 horas. A confirmação das colônias suspeitas foi feita através das provas bioquímicas de fermentação tempestuosa, motilidade, redução do nitrato, fermentação da lactose e liquefação da gelatina (Labbe 2001).

5.4.7 Contagem de *Bacillus cereus*

Realizou-se a contagem de *B. cereus* através da semeadura de 0,1 mL de cada diluição selecionada na superfície das placas de Petri contendo Ágar Yolk Polimixin (MYP) adicionado de solução de gema de ovo a 50,0%. As placas eram incubadas a 37°C por 24 horas. Das colônias consideradas típicas (esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo de precipitação, com toda a região do meio ao redor com uma coloração rósea leitosa) foram contadas, anotadas e, no mínimo cinco semeadas em ágar nutriente. Após, foram submetidas às seguintes provas: motilidade, redução do nitrato e beta-hemólise (Bennett & Belay 2001).

5.4.8 Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

Foram inoculadas 0,1 mL da amostra pura e das diluições em placas de Petri contendo Agar Cetrimide e incubadas a 35°C. Após 24 horas foi observada a presença de colônias com pigmentação esverdeada (pionicina) e com odor característico. Em seguida foi realizada a coloração de Gram e prova da oxidase (APHA 2005).

5.4.9 Contagem de Bolores e leveduras

Foram inoculadas 0,1 mL das diluições das amostras em placas de Petri contendo Ágar batata dextrose acidificado com ácido tártarico a 10,0%. As placas foram incubadas à 25°C durante cinco dias. Após este tempo foi feita a leitura das placas (Beuchat & Cousin 2001).

5.4.10 Isolamento de microrganismos de manipuladores

A coleta de amostras das mãos e fossas nasais dos manipuladores foi realizada com auxílio de *swab* previamente umedecido em solução salina.

A coleta das amostras de mãos foi realizada diretamente na superfície das mãos dos manipuladores, após higienização das mesmas com detergente e álcool 70,0%. O *swab* foi deslizado na palma das mãos, entre os dedos e nos contornos das unhas. Em seguida o *swab* foi mergulhado em tubo contendo caldo BHI.

A coleta de fossa nasal foi realizada pelo próprio manipulador que fazia movimentos circulares com o *swab* no interior da cavidade nasal. Em seguida, o *swab* foi armazenado em tubos contendo caldo BHI.

Staphylococcus aureus

- Os *swabs* de fossa nasal e mãos inoculados em tubo contendo caldo BHI foram incubados por 24 h a 35°C. Em seguida foram semeados, por estrias, em placas de Petri contendo Ágar Manitol salgado com incubação a 37°C/24 horas (Kloos & Bannerman, 1999). Após a incubação, foram selecionadas colônias suspeitas de pertencerem ao gênero *Staphylococcus* para identificação: ao redor das colônias o meio muda de cor de vermelho a amarelo indicando a fermentação do manitol (Kloos & Bannerman 1999). Procedeu-se a identificação como descrito no item 5.4.4.

Escherichia coli

- No caso das amostras obtidas das fossas nasais e mãos dos manipuladores, ou seja, a partir dos tubos de caldo BHI incubados, foram semeadas, por estrias, em placas de Petri contendo Ágar EMB. Após a semeadura as placas foram incubadas de forma invertida, em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Completado o período de

incubação verificou-se a presença de colônias lactose positivas, ou seja, colônias negras metálicas ou com o centro negro, com transparência na periferia. A identificação foi realizada como descrito no item 5.4.3.

5.4.11 Antibiograma

Como teste fenotípico de tipagem bacteriana, foi realizado o teste de susceptibilidade de todos isolados para diferentes antibióticos usando a técnica de difusão em Agar (Bauer et al. 1966, CLSI 2009). Os antibióticos usados foram trimetoprim, ciprofloxacina, ampicilina, gentamicina, tetraciclina e cefalotina para as cepas de *E. coli*, eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina para as cepas de *S.aureus*.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI (2009) sendo “R” – resistência, “I” suscetibilidade intermediária e “S” - sensibilidade. Os resultados destes testes foram analisados depois de 18-24 horas de incubação a 35°C.

5.4.12 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) para *E. coli*

O perfil genético dos isolados de *E. coli* foi determinado por *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) do DNA digerido pela endonuclease de restrição *Xba*1, utilizando o aparelho CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories®, Hercules, CA, USA) de acordo com Ribot et al (2006) com algumas modificações; como a agarose utilizada para a confecção dos plugs.

Foi semeada uma colônia de cada cepa de *E. coli* em Tryptic Soy Agar (TSA) e após 24h de incubação, as colônias foram transferidas com o auxílio de swab umedecido com tampão de suspensão (100mM Tris, 100mM EDTA pH 8,0), para tubos esterilizados contendo 2mL do tampão de suspensão e então ajustada a concentração para 1,3 -1,4 em 610nm em espectrofotômetro.

Em seguida foram transferidos para um eppendorf 200 µL da suspensão de bactérias e adicionado 10µL de Proteinase K (20mg/mL – estoque) homogeneizada com 200µL de agarose de corrida (agarose running gell, Sigma-EUA) 1,0% para formação de pequenos blocos de gel (*plugs*) contendo DNA cromossômico.

Os blocos de gel foram transferidos para tubos Falcon contendo 5mL de tampão de lise [50mM Tris, 50mM EDTA pH 8,0; 1,0% sarcosil; 0,1mg/mL

proteínase K] e incubados a 54°C por um período de duas horas em banho maria (BM). Após esse período, o tampão de lise foi desprezado e os blocos de gel foram lavados duas vezes com 10mL de água Milli-Q esterilizada pré aquecida a 50°C em BM com agitação por 10-15'/50°C e lavados quatro vezes com 10mL de tampão TE (10mMTris, 1mM EDTA, pH 8.0) esterilizado e pré-aquecido a 50°C em BM com agitação por 10-15'/50°C. Em seguida os plugs foram estocados em tampão TE sob refrigeração.

Para cada isolado, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 2µL da enzima *Xba*I (40U/µL) (Invitrogen, EUA) em 200 µL do tampão de restrição 1X e incubado a 37°C durante a noite em BM. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1,0% (agarose running gell, Sigma, EUA), em solução tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5x (Tris 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Para a resolução dos fragmentos de restrição foi utilizado corrente alternando com intervalos de pulso de 5 a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 14°C por 19 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução aquosa contendo 0,5µL/mL de brometo de etídio durante 10 minutos, descorados em água destilada, fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e capturados com o sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad). As fotos foram digitalizadas para análise posterior. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFGE (New England Biolabs, Ipswich, MA) posicionado nas extremidades e no centro do gel.

5.4.13 Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) para *S. aureus*

O perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico dos isolados de *S. aureus* foi determinado pela técnica de eletroforese em gel em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE) após digestão do cromossomo bacteriano com a enzima de restrição *Sma*I. Esta técnica foi realizada segundo protocolo estabelecido por Chung et al (2000).

Uma colônia de cada isolado de *S. aureus* foi inoculada em 5mL de TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubada a 37°C por 18-24 horas, sob agitação. Após esse período, uma alíquota de 500µL da suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 14.000g por dois minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado. O sedimento foi resuspenso em

500µL da solução tampão Tris-NaCl (Tris 10mM, pH 8,0, NaCl 1M) e novamente centrifugado a 14.000g por dois minutos. Em seguida, o sedimento foi resuspenso em 200µL de solução tampão Tris-NaCl e a concentração celular ajustada com a mesma solução tampão pelo cálculo da OD_{620nm} ($Vol_{add} (\mu L) = OD \times 40 \times 210 - 210$). Uma alíquota de 100µL da suspensão celular ajustada foi homogeneizada com 100µL de gel de agarose LMP (Low Melting Point agarose, Invitrogen) 1,5% para formação de pequenos blocos de gel (*plugs*) contendo DNA cromossômico. Os blocos de gel foram incubados a 37°C por um período de cinco horas em solução EC (Tris 6mM, pH 8,0; NaCl 1M; EDTA 0,1M, pH 8,0; desoxicolato de sódio 0,2% e sódio lauril sarcosina 0,5%) acrescida de uma solução de lise composta por lisozima (100 µL/mL – Sigma) e lisostafina (50µL/mL – Sigma). Após esse período, a solução EC-lise foi desprezada e os blocos de gel novamente incubados em solução ES (EDTA 0,5 M, pH 9,0 e sódio lauril sarcosina 1,0%) com Proteinase K (1mg/mL) (Invitrogen) por um período mínimo de 17 horas à uma temperatura de 50°C. Após a incubação, os blocos de gel foram lavados (cinco lavagens com incubações de 30 minutos cada) com a solução tampão Tris-EDTA (Tris 10mM, pH 7,5 e EDTA 1mM, pH 8,0) e armazenados nesta solução a 4°C até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

Para cada isolado, o DNA contido no bloco de gel foi digerido com 2µL da enzima *Sma*I (20U/µL) (Invitrogen, EUA) em 40µL do tampão de restrição 1X e incubado a 25°C por uma noite. A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1,0% (Sigma, EUA), em solução tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5x (Tris 90mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2mM) no sistema CHEF DRII (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Para a resolução dos fragmentos de restrição foi utilizado corrente alternando com intervalos de pulso de cinco a 35 segundos a 6 V/cm e temperatura de 11,3°C por 23 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução aquosa contendo 0,5µL/mL de brometo de etídio durante 10 minutos, descorados em água destilada, fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta e capturados com o sistema Molecular Imager GelDoc XR (Bio-Rad). As fotos foram digitalizadas e para análise posterior. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFGE (New England Biolabs, Ipswich, MA) posicionado na primeira e última coluna de cada gel e três cópias da cepa de referência *S.*

coagulase positiva NCTC 8325 (número de acesso GenBank CP000253) a cada seis isolados em todos os géis de PFGE.

A análise do perfil dos fragmentos de macrorrestrição resultantes foi inicialmente realizada por inspeção visual segundo os critérios sistematizados por Tenover et al (1995): (i) **cepas geneticamente indistinguíveis**, quando as cepas apresentarem perfil de restrição com o mesmo número de bandas e correspondência de tamanho entre elas; (ii) **cepas estritamente relacionadas**, quando as cepas diferirem em duas a três bandas nos perfis de restrição; (iii) **cepas possivelmente relacionadas**, quando as cepas diferirem em quatro a seis bandas nos perfis de restrição e (iv) **cepas não relacionadas**, quando as cepas diferirem em sete ou mais bandas nos perfis de restrição

Adicionalmente, os géis de PFGE foram utilizados como imagens preto e branco invertidas de oito bits e processados pelo programa BioNumerics (versão 5.0; *Applied Maths, Ghent, Belgium*). O processo de normalização intra e inter géis foi padronizado com a cepa de referência *S. aureus* NCTC 8325 (que sob digestão com a enzima de restrição *Sma*I produz bandas visíveis entre 674 kb 36 kb). Todas as bandas dos isolados situadas acima da maior (674 kb e menor banda (36 kb) da NCTC 8325 foram excluídas da análise.

A construção do dendrograma, para avaliar a relação genética entre as cepas foi realizada utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice (Dice 1945), baseado na posição e presença das bandas e no algoritmo de análise filogenética UPGMA (*Unweighted Pair-Groups Method*) através de agrupamentos por médias não ponderadas (Sneath and Sokal 1973). Os parâmetros de otimização e tolerância foram utilizados com os respectivos valores, 0,7 e 1,0%. Um pulsotipo (PT) foi definido como um único perfil eletroforético, assim os isolados com perfis de restrição idênticos foram considerados dentro do mesmo tipo e identificados com uma letra maiúscula. Cepas apresentando o perfil de eletroforese com uma a três bandas diferentes foram consideradas fortemente relacionadas sendo classificadas como subtipos (ST) indicados no dendrograma com a letra maiúscula seguida de numeral arábico. Os isolados com mais de três bandas diferentes foram considerados tipos diferentes. Cada *cluster* de isolados foi definido como um agrupamento de perfis ($n \geq 2$) apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80% (Carriço et al. 2005).

5.4.14 Análise Estatística

A análise dos resultados microbiológicos, comparando a taxa de contaminação entre os dois hospitais estudados, foi avaliada utilizando-se o teste do χ^2 para comparação entre os valores percentuais (variáveis qualitativas) quando o **n** for maior que cinco e o teste exato de Fisher quando o **n** for igual ou menor que cinco. A significância estatística foi definida por um valor de **p** menor que 0,05 e quando o intervalo de confiança do RR (risco relativo) não incluir o valor 1. A análise das variáveis foi executada utilizando-se o Epi Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (Anexo 3).e do Hospital de Urgências de Goiânia (Anexo 4)

Todos os manipuladores de alimentos da Unidade de Dietas Especiais do HC e HUGO foram procurados previamente, para esclarecimento sobre as características do estudo e assim, preencherem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1 e 2)

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acco M, Ferereira FS, Henrique JAP, Tondo EC 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol* 20: 489-493.

Akineden Ö, Annemüller C, Hassan AA, LämmLer C, Wolter W, Zschöck M 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immun* 8: 959-964.

Alcaraz LE, Satorres SE, Sepulveda L, Centorbi ONP 1997. Detección de *Staphylococcus aureus* sp. en manipuladores de alimentos. *La Alimentación Latino americana* 219: 44-47.

Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF 1995. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Rev Saúde Pública* 29: 290-294.

Alouf JE, Muller-Alouf H 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 292: 429-40.

Altekruse SF, Street DA, Fein SB, Levy AS 1996. Consumer knowledge of foodborne microbial hazards and food-handling practices. *J Food Prot* 59: 287-294.

Anderton A 1993. Bacterial contamination of enteral feeds and feeding system. *Clin Nutr* 12: 16 Supplement 2.

Andrews WH, Flower RS, Silliker J, Bailey JS 2001. *Salmonella*. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*. Washington. p.75-95.

APHA American Public Health Association 2005. 9213 E. Membrane Filter Technique for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Eaton LS, Clesceri EWR, Arnold EG. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th edition: Centennial Edition, 9-33p.

Belknap DC, Davidson LJ, Flournoy DJ 1990. Microorganisms and diarrhea in enterally fed intensive care unit patients. *JPEN* 14: 622-628.

Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barret TJ, Wells JG, Baron R, Kobayashi J 1994. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 – associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *JAMA* 272: 1349-1353.

Bellizzi A, Santos CL, Costa EQ, Verruma-Bernardi MR 2005. Treinamento de Manipuladores de Alimentos: uma revisão de literatura. *Hig Alimentar* 19: 36-48.

Bennett RW, Belay N 2001. *Bacillus cereus*. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*. 4. ed. Washington. p. 311-316.

Berg RD 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiol*, Cambridge 4: 430-435.

Beuchat LR, Cousin MA 2001. Yeasts and Molds. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. APHA, Washington, 209-215p.

Bidet P, Kurkdjian PM, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, Bingen E 2005. Characterization of *Escherichia coli* O 157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J Med Microbiol* 54: 71-75.

Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, De Ryck R, Hauser PM, Petignat C, Francioli P 2001. Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 39: 3442-3445.

Bowling TE 1998. Colonic responses to enteral tube feeding. *Gut*: London 42: 147-151.

Brasil 1993. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.428/MS, de 26 de novembro de 1993. . *Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos*. Ministério da saúde. Publicado no Diário Oficial da União de 26/11/1993.

Brasil 1998. Ministério da Saúde. Portaria nº 2616 de 12 de Maio de 1998. *Estabelecem diretrizes e normas para a prevenção e controle das infecções hospitalares*. Brasília (DF). D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 13 de maio de 1998.

Brasil 1999. Ministério da Saúde. Portaria – MS nº 710 de 10 de junho de 1999. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 21 out. 2008.

Brasil 2000. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 63 de 06 de julho de 2000. Regulamento técnico para terapia de Nutrição Enteral. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 07 de julho de 2000. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 06 dez 2008.

Brasil 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001. *Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II*. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 10 de janeiro de. 2001.

Brasil 2002. Secretaria de Estado da Saúde de Goiás. Superintendência de Vigilância Sanitária. Centro de Informação Toxicológicas de Goiás (CIT). *Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico em Goiás em 1999 e em 2000*. Comunicação Pessoal.

Brasil 2008. Sistema de Vigilância em Saúde (SVS) /MS – *Estatísticas de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos*. Disponível em <http://www.portal.saude.gov.br>. Acesso em 05 ago. 2008.

Brenner DJ 1986. Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods – Family I. *Enterobacteriaceae- E. coli*, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 420-423.

Brod FCA, Varaschin EB, Cabral SO, Fiorentini A 2002. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de lanches comercializados em vias públicas em cidades da Região Fronteira Noroeste/RS. XVIII Congresso *Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre/RS. p. 3685.

Bryan FL 1984. Análise de risco nas empresas de alimentos. *Hig Alimentar* 3: 92-100.

Bryan FL, Jermini M, Schmitt R, Chilufya EN, Mwanza M, Matoba A 1997. Hazards associated with holding and reheating foods at vending sites in a small town in Zambia. *J Food Prot* 60: 391-398.

Buchanan RL, Deroever CM 1993. Limits in assessing microbiological food safety. *J Food Prot* 56: 725-729.

Bussy V, Marechal F, Nasca S 1992. Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. *J Parenter Enteral Nut* 16: 552-557.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH 1999a. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob Agentes Chemother* 43: 1379-1382.

Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH 1999b. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* 159: 1127-1132.

Carmo LS, Dias RS, Anunciação LLC, Bergdoll MS 1995. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zoo* 47: 113-122.

Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Sousa NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43:5483-5490.

Carvalho MLR 1998. *Avaliação da qualidade microbiológica de dietas enterais: Pontos críticos no controle no processamento das formulações*. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 195p.

Carvalho MLR, Moraes TB, Amaral DF; Sigulem DM 2000. Hazard analysis and critical control point system approach in the evaluation of environmental and procedural sources of contamination of enteral feedings in three hospitals *JPEN* 24: 296-303.

Cassin MH, Lammerding AM, Todd ECD, Ross W, McColl RS 1998. Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *Int J Food Microbiol* 41: 21-44.

Cato EP, Lance George W, Finegold SM 1986. Genus *Clostridium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 1141-1200.

Cavalli SB 2001. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. *Rev. Nutri.* 14: 41-46.

Cavalli, SB, Salay E, Pereira JL, Netto FM, Mercadante AZ 2001. *Food Safety Issues in Developing Nations: A Case Study of Brazil*. In: Hooker, N. H.; Muraro, E.A. (Org.). *Interdisciplinary Food Safety Research*. Boca Raton London New York, Wa: CRC Press, p. 87-120.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 1995. Outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infection associated with eating raw ground beef – Wisconsin, 1994. *MMWR* 55: 1-34.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2001. *Salmonellosis, Estados Unidos, June 2001*. Disponível em <http://www.cdc.gov>. Acesso em 07 jun. 2008.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2006. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks --- United States, 1998—2002. . *MMWR* 55; 1-34

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2009. *Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Linked to Eating Raw Refrigerated, Prepackaged Cookie Dough*. Disponível em www.cdc.gov. Acesso em 28 ago 2009.

Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI/MS) 2001. *Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. 136p. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acesso em 03 maio 2008.

Chung MLH, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P; Multilaboratory Project Collaborators 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6:189-198.

Claus D, Berkeley RCW 1986. Genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 1105-1139.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth informational supplement M100-S19*. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute p 26-138.

Cliver DO 1993. Research needs in food safety. *Food Tech* 47: 10-13.

Cogco LG, Vázquez EM, Pérez PA, Andrade MCG 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Rev Salud Pública México* 42: 1-9.

Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M 1997. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 28:279-83.

Corrêa B 1998. Fungos toxigênicos: panorama nacional. In: Encontro nacional de micotoxinas; simpósio em armazenamento qualitativo de grãos do mercosul, 9., 1998, Florianópolis. *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. Florianópolis: V.M. Scussel, 2000. p. 162-168.

Correia MITD, Caiaffa WT, Waitzberg DL 1998. Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar (IBRANUTRI): Metodologia do estudo multicêntrico. *Rev Bras Nut Clin* 13: 30.

Correia MITD, Novais JAV, Cassiano MC 2005. Controle de infecção na terapia Nutricional enteral e parenteral. In: *Oliveira AC. Infecções hospitalares - Epidemiologia, prevenção e controle*. São Paulo: Medsi, 562-573.

Costa EA 2006. *Vigilância Sanitária e Proteção da Saúde*. Disponível em <http://www.saude.ba.gov.br>. Acesso em 10 jun. 2008.

Costa GP, Silva MLT, Ferrini MT, Bottoni A, Moreira Jr JC, Coppini LZ, Aanholt DV, Borges VC, Ciosak S, Waitzberg DL 1998. Estudo comparativo da contaminação microbiana das Dietas enterais em sistema aberto e fechado. *Rev Bras Nutr Clin* 13: 180-188.

Costa LLB 2008. *Hospital de Urgências de Goiânia (HUGO)*. Disponível em www.saude.go.gov.br. Acesso em 05 dez. 2008

Council for Agricultural Science and Technology (CAST) 1994. Foodborne pathogens - risks and consequences. *Ames* 122, 87p.

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/DSMZ 2009. *Bacteria: Staphylococcus*. Disponível em www.dsmz.de. Acesso em 01 set. 2009.

Dice LR, 1945. *Measures of the amount of ecological association between species*. pp. 297-302.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34.

Domene SMA, Galeazzi MAM 1997. Prescrição e uso de formulados para nutrição enteral pelos serviços de nutrição hospitalares do município de Campinas – São Paulo, Brasil. *Rev Nutr* 10: 114-119

Donnenberg MS, Whittam TS 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Investig* 107: 539-548.

Doyle L 2000. William Stark (1740-1770): his life, manuscript and death. *J Med Biogr* 8: 146-148.

Esen S, Leblebicioglu H 2004. Prevalence of nosocomial infections at intensive care units in Turkey: a multicentre 1-day point prevalence study. *Scand J Infect Dis* 36: 144-8.

Faintuch J, Battaglia C, Dias MCG, Maluf F, Libanori HT, Leme RBA, Faintuch BL, Maculevicius J, Pinotti HW 1990. Contaminação de dieta enteral em ambiente nosocomial. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo, São Paulo*, 45: 248-52.

Felipe MR, Deolindo JP, Mafra D, Matos CH 1995. Manipuladores de alimentos portares de *Salmonella* spp.: Implicações na produção de alimentação coletiva. *Hig Alimentar* 9: 18-20.

Fernandez AT, Fontes MLM, Alexandre MHS, Bastos CSP 2000. *Ocorrência de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos na Cidade do Rio de Janeiro. Superintendência de Controle de Zoonoses e Fiscalização Sanitária-RJ.*

Ferreira TRAS, Santos JS, Soares RDL 2001. Serviço de nutrição hospitalar. In: *Martins MA. Manual de infecções hospitalares: 2. ed.* Rio de Janeiro, 751-762.

Food and Drug Administration (FDA) 2002. Bacteriological Analytical Manual online. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em 20 abr. 2008.

Food and Drug Administration (FDA) 2008a. *Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook- Salmonella spp.* Disponível em <http://www.cfsa.fda.gov>. Acesso em 07 jun. 2008.

Food and Drug Administration (FDA) 2008b. *Bacillus cereus and other Bacillus spp.* Disponível em <http://www.cfsa.fda.gov>. Acesso em 07 jun. 2008.

Food and Drug Administration (FDA) 2008c. *Clostridium perfringens*. Disponível em <http://www.cfsa.fda.gov>. Acesso em 07 jun. 2008.

Foxman B, Riley LW 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol* 153: 1135-1141.

Franco BDGM, Landgraf M 2003. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 182p.

Fueyo JM, Martín MC, González-Hevia MA, Mendoza MC 2001. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. *Int J Food Microbiol* 67: 139-145.

Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32: 146-155.

Garcia BM 1996. Factores que influncian la supervivencia y la multiplicación de los microorganismos en los alimentos. *Alimentaria* 96: 19-25.

Garcia-Cruz CH, Hoffmann EL, Bueno SM 2000. Monitoramento microbiológico de lanches vendidos por ambulantes na parte central da cidade de São José do Rio Preto, SP. *Hig Alimentar* 14: 48-51.

Germano MIP, Germano PMI, Castro AP, Andrighetto C, Babadopulus P, Koshio S, Pedro SCM, Colombari V 2000. Comida de rua; prós e contras. *Hig Alimentar* 14: 27-33.

Germano MIS 2003. *Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde*. Varela, São Paulo. 165p.

Góes JAW 2001. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. *Hig Alimentar* 15: 20-22.

Goñi P, Vergara Y, Ruiz J, Vila J, Gómez-Lus R 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int J Antimicrob Agents* 23: 268-272.

Governo do Estado de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saude. *Lista de verificação de emergências*. Disponível em www.saude.mg.gov.br/publicacoes. Acesso em 28 ago 2009.

Grahan S 1993. Frequency of changing enteral alimentation bags and tubing and adverse clinical outcomes in patients in a long term care facility. *Can J Inf Cont* 8: 41-43.

Hoefnagels-Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 35: 2514-2520.

Hortua AA 1993. Análise de riscos e pontos críticos de controle. Brasília. *Apostila do curso de Vigilância Epidemiológica e Sanitária no Serviço de Nutrição e Dietética - SND em Hospitais*, Curitiba/PR. 36p.

Huamán JP 1996. Las tecnologías apropiadas para la venta callejera de alimentos. In *Albert JL. Food, nutrition and agriculture 17/18: street foods*. 1996. Disponível em <http://www.foa.org>. Acesso em 18 jun. 2007.

Hunskins WC, O'Rourke EJ, Rhinehart E, Goldmann DA 2004. Infection control in countries with limited resources. In: *Mayhall CG. Hospital epidemiology and infection control*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1889-1912.

Ingram M, Simonsen YB 1985. Carne y productos cárnicos. In *Ecología microbiana de los alimentos 2*. ICMSF. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, Espanha. p. 333-409.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 1980. *Microbial Ecology of Foods. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. New York. 259p.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Codex Alimentarius Commission 1993. Guidelines for the application of the Hazard Analysis Critical Control Point System. *Supplement 1*: 96.

International Commission Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 1996. Microorganism in Foods. *Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional. New York, NY, p.112-125.

Jablonski LM, Bohach GA 1997. *Staphylococcus aureus*. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, American Society for Microbiology, Washington. p. 353-375.

Johnston AM 1990. Foodborn illness. Veterinary sources of food illness. *Lancet* 336: 856-858.

Jones TF, Gerber DE 2001. Perceived etiology of foodbornes illness among public health personal. *Emerg Infec Dis* 5: 904-905.

Käferstein FK 1997. Food safety: a commonly underestimated public health issue. *World Health Stat Q* 50: 3-4.

Kaku M, Peresi JTM, Tavechio AT, Fernandes SA, Batista AB, Castanheira IAZ, Garcia GMP, Irino K, Gelli DS 1995. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 29: 127-131.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123-140.

Kessler FP, Cardoso VA, Santos AB, Wady MTP, Farage S, Tortora JCO 2000. Avaliação microbiológica de dietas enterais artesanais utilizadas no hospital Universitário Antonio Pedro. *Rev Bras Nut Clín* 15: 426-435.

Kloos WE, Schleifer KH 1986. Genus IV: *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 1013-35.

Kloos WE, Bannerman TL 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH Manual of Clinical Microbiology*, Washington. p. 264-282.

Kluytmans J, Leeuwen WV, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, Leeuwen NV, Belkum AV, Verbrugh H 1995. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno - and genotyping. *J Clin Microbiol* 33: 1121-1128.

Knabel SJ 1995. Foodborne illness: role of home food handling practices. *Food Tech* 49: 119-131.

Kohn CL 1991. The relationship between enteral formula contamination and length of enteral delivery set usage. *JPEN* 15: 567-71.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC 2001. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1465 p.

Kornacki JL, Johnson JL 2001. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and safety Indicators. In: *Downes FP, Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*, Washington. p. 75-95.

Labarca J 2002. Utilización del antibiotipo como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular. *Rev Chil Infectol* 19: S157-160.

Labbe RG, Harmon SM 1992. *Clostridium perfringens*. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Washington. p. 325-330.

Labbe RG 2001. *Clostridium perfringens*. Capítulo 34. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*, Washington. p. 325-330.

Lancette GA, Bennett RW 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Downes FP, Ito k. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*, Washington. p. 533-550.

Lázaro NS 1994. Comportamento de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos frente a antimicrobianos. *Rev B Med Vet* 16: 198-201.

Lazzari FA 1997. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, p.148.

Leandro VA 1990. Suporte nutricional: Princípios básicos da nutrição enteral. *Rev Nutr* Campinas 3: 80-95.

Lee SC, Fung CP, Liu PY, Wang TC, See LC, Lee N, Chen SC, Shieh WB 1999. Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outborne. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20: 205-207.

Le Loir Y, Baron F, Gautier M 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen Mol Res* 2: 63-76.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95: 38-43.

Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S 1999. Population biology, evolution and infectious disease: convergence and synthesis. *Science* 283: 806-9.

Li S, Marquart RR, Abramson D 2000. Immunochemical detection of molds: a review. *J Food Protec*, 63: 281-291.

Lima VLAG, Melo EA, Sena EM 1998. Condições higiênico-sanitárias de “Fast-food” e restaurantes da região metropolitana do Recife-PE. *Hig Alimentar* 12: 51-54.

Lima ARC, Barros RMS, Cardonha MAS, Dantas MAM 2005. Avaliação microbiológica de dietas enterais manipuladas em um hospital. *Acta Cirúrgica Brasileira* 20: 27-30.

Lina G, Bohach GA, Nair SP, Hiramatsu K, Jouvin-Marche E, Mariuzza R 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189: 2334-2336.

Lindback T, Fagerlund A, Rowland MS, Granum PE 2004. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150: 3957-3967.

Livera AVS, Santos ACO, Melo E 1996. Condições higiênico-sanitárias de segmentos da cadeia alimentar do Estado de Pernambuco. *Hig Alimentar* 10: 28-32.

Loguercio AP, Aleixo JAG 2001. Microbiologia de queijo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural* 31: 1063-1067

Loncarevic S, Jorgensen HJ, Løvseth A, Maticen T, Rørvik LM 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J Appl Microbiol* 98: 344-350.

Lucchese G 2001. *Globalização e regulação sanitária. Os rumos da Vigilância Sanitária no Brasil*. Tese de doutoramento. ENSP/FIOCRUZ. Disponível em <http://www.portalteses.cict.fiocruz.br>. Acesso em 03 mar. 2008.

Lund BM 1990. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336: 982-986.

Machado GPM 2001. Aspectos epidemiológicos das infecções hospitalares. In: *Martins MA*. Manual de infecções hospitalares. 2 ed. Rio de Janeiro, p. 27-31.

Maciel CHP, Pinheiro MS, Vilas Boas GV 2002. Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em manipuladores de alimentos de uma indústria de linguiça do estado do Rio de Janeiro. *XVIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Porto Alegre-RS. p. 3240.

Madeira M, Ferrão MEM 2002. *Alimentos conforme a lei*. São Paulo. 444p. Editora Manole. 463p.

Maldonado Y, Fiser JC, Nakatsu CH, Bhunia AK 2005. Cytotoxicity potential and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from environmental and food sources. *Appl Env Microbiol* 71: 1890-1898.

Mark S, Roberts T 1993. *E. coli* O157:H7 ranks as the fourth most costly foodborne disease. *Food reviews* 16: 51-59.

Martín MC, Fueyo JM, González-Hevia MA, Mendoza MC 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three poisoning outbreaks. *Int J Food Microbiol* 94: 279-86.

Martins JFL, Martins ADO, Milagres RCRMM, Andrade NJ 2007. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from enteral diets in a public hospital of Minas Gerais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* 28: 9-14.

Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Inf Dis* 17: 153-164.

Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK 1996. Rapid Preparation of Bacterial DNA for Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34: 2598-2600.

Maurício AA, Genta TMS, Matioli G 2005. Verificação das Boas Práticas de preparação e análise microbiológica de dieta enteral em serviço de nutrição e dietética de hospital privado. *Acta Sci Health Sci* 27: 157-161.

Mead OS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.

Mead PS, Finelli L, Lambert-Fair MA, Champ D, Townes J, Hutwagner L, Barret T, Spitalny K, Mintz E 1997. Risk factors for sporadic infection with *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Int Med* 157: 204-208.

Mempel M, Lina G, Hojka M, Schnopp C, Seidl HP, Schafer T, Ring J, Vandenesch F, Abeck D 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 306-309.

Mendonça SC, Correia RTP, Albino E 2002. Condições higiênico-sanitárias de mercados e feiras – livres da cidade de Recife –PE. *Hig Alimentar* 16: 20-25.

Minor LL 1984. Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods – Family I. *Enterobacteriaceae - Salmonella spp.* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 427-457.

Mitne C, Simões AMG, Wakamoto D, Liori GP, Sullivan M, Comer GM 2001. Análise de dietas enterais artesanais. *Rev Bras Nutri Clin* 16: 100-109.

Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 40: 2119-2125.

Morais VAD 2003. Avaliação microbiológica de amostras de refrigerantes comercializadas no Estado de Minas Gerais. *Rev Inst Adolfo Lutz* 62: 1 - 4.

Moreno P, Fagoaga F, Torregrossa A, Garcia M 1996. Analisis microbiológico de comidas servidas en comedores colectivos. *Alimentaria* 96: 19-23.

Mossel DAA, Jansen JT, Struijk CB 1999. Microbiological safety assurance applied to smaller catering operations world-wide. *Food Control* 10: 195-211.

Motarjemi Y, Käferstein FK 1997. Global estimation of foodborne diseases. *World Health Stat Q* 50: 5-11.

Moura MRL, Reyes FGR 2002. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. *Rev Nutr* 15: 223-238.

Moura MEB, Campelo SMA, Brito FCP, Batista MA, Araújo TME, Oliveira ADS 2006. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino *Rev Bras Enferm* 60:4.

Muniz CK 2005. *Análise de perigos e pontos críticos de controle em dietas enterais manipuladas em hospital universitário público do Brasil*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 71p.

Munuera I, Garcia D, Ibáñez JJ 1997. Niveles guía, limites máximos admisibles, criterios microbiológicos y otros valores de referencia en análisis microbiológicos de alimentos e bebidas. Vacios legales, emisión de dictámenes. *Alimentaria* 97: 39-42.

Nataro JP, Kaper JB 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11: 142-201.

Neto JG 2008. Hospital das Clínicas. Disponível em www.hc.ufg.br. Acesso em 05 dez. 2008

Notermans S, Borgdorff M 1997. A global perspective of foodborne disease. *J Food Prot* 60: 1395-1399.

Okuma T, Nakamura M, Totake H, Fukunaga Y 2000. Microbial contamination of enteral feeding formulas and diarrhea. *Nutrition* 16:719-22.

Olive DM, Bean P 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.

Oliveira MA, Moron RA 1997. História da nutrição enteral. In: *Pinotti H W. et al. Nutrição enteral em cirurgia*. São Paulo: Fundação BIK, p. 17-20.

Oliveira MH, Bonelli R, Aidoo KE, Batista CRV 2000. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. *Nutrition* 16: 729-733.

Oliveira MH, Batista CRV, Aidoo KE 2001. Applications of Hazard Analysis and Critical Control Points system to enteral tube feeding in hospital. *J Human Nutr Diet* 14: 397-403.

Oliveira AM, Gonçalves MO, Shinohara NKS, Stamford TLM 2003. Manipuladores de alimentos, um fator de risco. *Hig Alimentar* 17: 12-19.

Olsen SJ, Mackinon LC, Goulding JS 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. *MMWR* 49: 1-51.

Pan TM, Wang TK, Lee CL, Chien SW, Horng CB 1997. Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J Clin Microbiol* 35: 1260-1262.

Passos MHCR, Kuaye AY 1996. Avaliação dos laudos analíticos, de alimentos coletados pela vigilância sanitária de Campinas – SP, no período de 1987 a 1993. *Hig Alimentar* 10: 7-10.

Pedruzzi MMB 2002. Imunologia da mucosa intestinal – uma nova abordagem funcional e terapêutica do trato gastrointestinal. *Rev Nutr em Pauta*, 57: 36-41.

Pereira SCL 2001. *Caracterização molecular e fatores de virulência de Klebsiella sp. isoladas de dietas enterais*. Tese [Doutorado em Microbiologia Agrícola]. Viçosa, Minas Gerais, 137p.

Pinto FAC, Santos CD, Vale VL, Porto MLG, Bezerra FSBC 2001. Monitoramento da produção de aflatoxina nos alimentos na cidade de Fortaleza, realizado no LACEN – Ceará. In: *Encontro nacional de analistas de alimentos*, 12, 2001, Maceió. *O aabinonalista e a gestão da qualidade*. Maceió: LACEN, 2001. p. 253.

Pinto UM, Cardoso RR, Vanetti MCD 2004. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Rev Nutr* 17: 319-326.

Pinto AFMA 2006. *Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos*. Disponível em <http://www.ipv.pt>. Acesso em 09 jun. 2008.

Quevedo F 1984. Enfermidades transmitidas por los alimentos. *Hig Alimentar* 3: 167-172.

Raddi MSG, Leite CQF, Mendonça CP 1988. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev Saúde Pública* 22: 36-40.

Radhika B, Padmapriya BP, Chandrashekar A, Keshava N, Varadaraj MC 2002. Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *Int J Food Microbiol* 74: 131-8.

Razem D, Razem BK 1994. The incidence and costs of foodborne diseases in Croatia. *J Food Prot* 57: 746-753.

Rêgo JC, Pires EF, Medina GPO 1999. Treinamento como instrumento de qualidade higiênica, em Unidade de Alimentação e Nutrição Hospitalar. *Hig Alimentar* 13: 81-86.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ 2006. Standardization of Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O:157 H:7, *Salmonella*, and *Shigella* for PULSENET. *Foodborne Pathogens and Disease* 3: 59-67.

Roberts CA, Lyman E 2008. Microbial Contamination of Enteral Feeding Sets Used in the Home of Pediatric Patients. *NCP* 23: 85-89.

Roberts D 1990. Sources of infection: food. *Lancet* 336: 859-861.

Rooney RM, Cramer E, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, Benembarek PK 2004. A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. *Pub Health Rep* 119: 427-434.

Rouquayrol MZ, Filho NA 2003. Epidemiologia e saúde. 6ª ed. Maedsi, São Paulo. 728p.

Russo TA, Johnson JR 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181: 1753-1754.

Sabino M 1995. Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: Simpósio internacional sobre micotoxinas e micotoxicoses em aves, 1995, Curitiba. *Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses*. Campinas: FACTA, p. 35-47.

Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 8: 25-79.

Santos MIS, Tondo EC 2000. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário. *Rev Nutr* 13: 211-222.

Schneider KR, Parish ME, Goodrich RM, Cookingham T 2006. *Preventing Foodborne Illness: Bacillus cereus and Bacillus anthracis*. Disponível em <http://www.edis.ifas.ufl.edu>. Acesso em 08 jun. 2008.

Schroeder CM, White DG, Ge B, Zhang Y, McDermott PF, Ayres S, Zhao S, Meng J 2003. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *Int J Food Microbiol* 85: 197-202.

Schroeder CM, White DG, Meng J 2004. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol* 21: 249-255.

Schwartz DC, Cantor CR 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.

Senna JPM, Pinto CA, Carvalho LPS, Santos DS 2002. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and PCR analysis of polymorphisms on the *mec*

hypervariable region for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 40: 2254-2256.

Sgarbieri VC 1993. Processamento de alimentos e nutrição. *Rev Nutrição da PUCCAMP* 6: 97-114.

Shopsin B, Kreiswirth BN 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7: 323-326.

Silva Jr EA 2005. *Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação*. São Paulo: Varela, 623p.

Silva JA, Silva WD 2005. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa eritrócitos. *Rev Patol Trop* 34: 175-196.

Singer RS, Sischo WM, Carpenter TE 2004. Exploration of biases that affect the interpretation of restriction fragment patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 42: 5502-5511.

Smith JL, Fratamico PM 1995. Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. *J Food Prot* 58: 696-708.

Sneath PHA, Sokal RR 1973. *Numerical taxonomy*. pp. 573.

Sneath PHA 1986. *Bacillus Cereus* - Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, USA. p. 1104-1138.

Sociedade Brasileira de Nutrição Enteral e Parenteral (SBNEP) 2000. Informativo da Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral. Ano VI , n.25, Jan./Fev. 2000.

Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet Microbiol* 96: 91-102.

Souza SS, Pelicioni MCF, Pereira IMTB 2003. A vigilância sanitária de alimentos como instrumento de promoção de saúde: relato de experiência de educação em saúde para o comércio varejista de alimentos e construção de um projeto de parceria. *Hig Alimentar* 17: 33-37.

Sousa LC, Campos GD 2003. Condições higiênico-sanitárias de uma dieta hospitalar. *Rev Nutr* 16: 127-134.

Spers EE, Kassouf AL 1996. A segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. *Hig Alimentar* 10: 18-21.

Stevenson KE, Segner WP 2001. Mesophilic aerobic sporeformers. In: *Downes FP, Ito k. Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*, Washington.

Steele FM, Wright KH 2001. Cooling rate effect on outgrowth of *Clostridium perfringens* in cooked, ready-to-eat Turkey breast roasts. *PSA* 80: 813-816.

Strulens MJ 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2: 50-59.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-39.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18: 426-439.

Thurn J, Crossley K, Gerdts A, Maki M, Johnson J 1990. Enteral hyperalimentation as a source of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 15: 203-217.

Todd ECD 1997. Epidemiology of foodborne diseases: a worldwide review. *World Health Stat Q* 50: 30-50.

Tosin I, Silbert S, Sader HS 2003. The Use of Molecular Typing to Evaluate the Dissemination of Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Rods in Brazilian Hospitals. *Braz J Infect Dis* 7: 360-369.

Toufen C, Hovnanian ALD, Franca AS, Carvalho CRR 2003. Prevalência de infecção em unidades de terapia intensiva de um hospital escola terciário. *Rev Hosp Clin*.58:254-259.

Trabulsi LR 2000. Os probióticos e a saúde infantil. Temas de Pediatria da Nestlé 6-9.

Tranter HS 1990. Foodborne staphylococcal illness. *Lancet* 336: 1044-1046.

Ungar ML, Germano MIS, Germano PML 1992. Riscos e conseqüências da manipulação de alimentos para a Saúde Pública. *Hig Alimentar* 6: 14-17.

Valente FLS 1997. Do combate à fome à segurança alimentar e nutricional: o direito à alimentação adequada. *Rev Nutr* 10: 20-36.

Valquez-Moreno L 1990. Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *J Food Select* 55: 632-634.

Van Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14: 547-560.

Vanderlinde PB, Fegan N, Mills L, Desmarchelier PM 1999. Use of pulse field gel electrophoresis for the epidemiological characterization of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. *Int J Food Microbiol* 48: 81-85.

Varnan AH, Evans MG 1991. *Foodborne pathogens – an illustrated text*. Wolfe Publishing. New York. p.221-228.

Villard L, Lamprell H, Borges E, Maurin F, Noel Y, Beuvier E, Chamba JF, Kodjo A 2005. Enterotoxin D producing strains of *Staphylococcus aureus* are

typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Food Microbiol* 22: 261-265.

Wagner DR, Emore MF, Kroli DM 1994. Evaluation of “closed” vs “open” systems for the delivery of peptide-based enteral diets. *JPEN* 18: 453-457

Waitzberg DL 2001. *Nutrição oral, enteral e parenteral na pratica clínica*. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 1858p.

World Health Organization (WHO) 1989. Métodos de vigilância sanitária y de gestión para manipuladores de alimentos: Informe de una reunión de consulta de la OMS, Ginebra. Disponível em: <http://www.whqlibdoc.who.int/>. Acesso em: 03 dez. 2008.

World Health Organization (WHO) 2001. Inocuidad de los alimentos y salud: WHO, 4p.

World Health Organization (WHO) 2002. *Foodborne diseases, emerging* (Revised edition). Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 15 ago. 2008.

World Health Organization (WHO) 2003. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of practice general principles of food hygiene. Rev 4. Rome: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/>. Acesso em 20 fev. 2008.

World Health Organization (WHO) 2005. *Drug-resistant Salmonella*, 2005 (Revised). Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 07 jun. 2008.

World Health Organization (WHO) 2006. *Basic Food Safety for Health Workers*. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 10 set. 2008.

World Health Organization (WHO) 2007. Food safety and foodborne illness. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 07 dez. 2008.

World Health Organization (WHO) 2008. Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Disponível em <http://www.who.int>. Acesso em 13 jan. 2009.

Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking, Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *J Clin Microbiol* 40: 3894-3902.

Zhao S, White DG, Ge B, Ayers S, Friedman S, English L, Wagner D, Gaines S, Meng J 2001. Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol* 67: 1558-1564.

Zschöck M, Kloppert B, Wolter W, Hamann HP, Lämmle C 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 108: 243-249.

ARTIGO 1

**MICROBIOLOGICAL QUALITY AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION
OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM ENTERAL FEEDING, FOOD
HANDLERS, AND ENVIRONMENTS OF TWO PUBLIC BRAZILIAN
HOSPITALS**

Este artigo foi publicado na Journal of Food Safety

(ANEXO 5)

**MICROBIOLOGICAL QUALITY AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION
OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM ENTERAL FEEDING, FOOD
HANDLERS, AND ENVIRONMENTS OF TWO PUBLIC BRAZILIAN
HOSPITALS**

Short title: Phenotyping of microorganisms of enteral feeding

Liana Jayme Borges^{1*}, Maria Raquel Hidalgo Campos², Maria Cláudia Dantas Porfírio
Borges André¹, Álvaro Bisol Serafini³

¹Departament of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Tropical
Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás

²Nutrition School, Federal University of Goiás

³Nutrition School, Federal University of Santa Catarina

* Correspondence to ^{1*} Liana Jayme Borges, Tropical Pathology and Public Health
Institute, Federal University of Goiás, Rua 235 esq 1ª Avenida, s/n, Setor Universitário,
74605-050, Goiânia, Goiás, Brazil. TEL: 55-62-3281-7172, FAX: 55-62-3209-6361, E-
mail: liana_jayme@yahoo.com.br

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the microbiological conditions of enteral feeding, water, powder module and personnel samples obtained from two public hospitals in Goiânia/GO, Brazil. The *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains isolated were submitted to antibiogram for phenotypic characterization. The *S. aureus* strains isolated were grouped into six phenotypic profiles (A-F). There was no correlation among strains isolated from diet and handlers samples. The *E. coli* strains were grouped into four phenotypic profiles (A-D). The *E. coli* phenotypes A and C showed the same susceptibility profile for microorganisms isolated from handlers and diets, suggesting a relationship among those isolates. Seven *S. aureus* and twelve *E. coli* isolates were resistant to two or more antibiotics. The diets presented unsatisfactory sanitary-hygienic conditions in the hospitals evaluated because forty-seven samples (58.8%) from the first hospital and thirty samples (37.5%) from the second hospital were above the limits established by Brazilian legislation.

Key words: Antibiogram, enteral feeding, quality control, food handling, food microbiology

PRACTICAL APPLICATIONS

Enteral nutrition is a very important mechanism to provide support to health-compromised patients, so the microbiological quality of this product is essential to guarantee its safety. This study emphasizes the importance of monitoring the enteral diet microbiological quality and the factors associated with its contamination. The study highlights the use of antibiogram as an instrument to correlate strains in order to help the identification of the probable origin of final product contamination.

INTRODUCTION

Enteral nutrition (EN) is defined as food for special purposes, with controlled intake of nutrients with defined or estimated composition, which is specially formulated and designed for use by oral or probe delivery. EN is used exclusively or partially to replace or supplement oral feeding in patients who may or may not be undernourished depending on their nutritional needs, in hospital environments or homes (Brasil 2000).

These diets can be administered through open or closed system. In the open system, the formula can require manipulation prior to its administration. In the closed system it would be necessary to use an industrialized and sterile EN, packaged in a hermetically sealed vial, and appropriated for connecting to the equipment that supplies the nutrition (Brasil 2000).

Nutritional support is used mainly for patients with a protein-energy deficiency, severe dysphagia, major burns, fistulas and bowel resection. Its primary function is in the synthesis or maintenance of tissues, organs or systems (Brasil 2000).

The wealth of macro and micronutrients in enteral feeding provides substrates for microbial growth (Brasil 2000). Different factors are involved in the contamination of enteral formulas, such as the quality of the ingredients and the dilution water, hygienic conditions of the environment and handlers, the distribution process and the method of administration.

The determination of the source of microorganisms for these products is important to prevent food contamination and its consequences. Among the phenotypic techniques used, the test of antimicrobial resistance has been especially useful due to its low cost, ease of implementation, and because it provides information about the resistance of microorganisms to antibiotics (Acco *et al.* 2003).

The aims of this study were to evaluate the sanitary conditions of enteral feeding produced by the Special Diets Unit (SDU) of two public hospitals in Goiania/GO and characterize *S. aureus* and *E. coli* strains isolated from personnel, raw ingredients and the final product by means of antibiogram to establish any relationship among the strains and the possible sources of EN contamination.

MATERIALS AND METHODS

Samples were collected from two public hospitals in the Central Region of Brazil. In hospital 1 (H1) from October 2007 to November 2008 and in the hospital 2 (H2), from November to December 2008, 80 samples of enteral diets were collected in sterile vials weekly and daily, respectively. Forty samples of 50 g module powder and 40 samples of water used in the diets formula were also collected from both hospitals. Using sterile swabs, 70 samples of the nasal cavity and 70 samples of ten food handler's hands involved in the diet preparation were collected in H1. The samples were collected on various dates, and the number of samples collected from each of the food handlers was different, according to the work schedule of the hospital: fourteen swab samples

(seven of nasal cavities and seven of hands) were collected from H1 handlers 1, 4 and 5. Twelve swab samples were collected from handlers 6, 7 and 10. Sixteen samples were collected from handlers 2 and 9, eight swab samples were collected from handler 3 and twenty two samples were collected from handler 8.

Forty samples of the nasal cavity and 40 samples from the four food handlers' hands were collected in H2; a total of twenty swab samples were collected from each food handler.

The study protocol was approved by the Ethical Committee from each hospital and the participants gave informed consent. During each visit, hand and nasal cavity samples were collected from the handlers who were working on that day. The swabs were immediately placed in Brain Heart Infusion (BHI) broth. The water, enteral diet and module powder samples were collected in sterile plastic vials supplied by the hospitals. All collected samples were transported in an isothermal box with ice to the Food Control Laboratory of the Goias Federal University and immediately analyzed.

The enteral diet, water and module samples were analyzed according to Brazilian legislation (Brasil 2000, 2001). The hands and nasal cavities swabs seeded in BHI broth were incubated at 37°C for 24 h, streaked on mannitol salt agar (MS - Merck) and eosin methylene blue agar (EMB - Merck) and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Based on colony morphology, Gram staining and biochemical tests, the colonies were identified as *Staphylococcus aureus* (Gram-positive coccus, acid from mannitol, catalase, DNase and coagulase positive) and *Escherichia coli* (Gram-negative bacilli, oxidase negative, acid and gas from glucose, acid from lactose, indole production and methyl-red test positive, acetoin production and citrate utilization negative) (APHA 2001). The isolates were stored at -80°C in tryptic soy broth (TSB - Merck) with 20% glycerol, awaiting further analyses.

The protocol for microbiological analysis of enteral diet, water and module samples included enumeration of aerobic mesophilic microorganisms, yeasts and molds, coliforms, *E. coli* and *S. aureus*, according to APHA (2001).

The results of the microbiological analysis were compared with the official standards established by Brazilian legislation (Brasil 2000, 2001). According to Brazilian legislation (Brasil 2000), the limit allowed for mesophilic microorganisms in enteral nutrition is $<10^3$ cfu/mL; for coliforms, *E. coli* and *S. aureus* the limit is <3 cfu/mL. The acceptable limits for the powder module are the following: mesophilic microorganisms, $<10^3$ cfu/g; coliforms, <3 cfu/g; and *S. aureus*, $<5.0 \times 10^1$ cfu/g (Brasil

2001). According to the same legislation, the limits for mesophilic microorganisms and coliforms in water are $<5.0 \times 10^2$ cfu/mL and none, respectively.

The antimicrobial susceptibility tests were performed by the standard disk diffusion method on Müller–Hinton agar (MH - Merck) and used as a phenotypic test for *S. aureus* and *E. coli* typing. The antimicrobial disks used were trimethoprim, ciprofloxacin, ampicillin, gentamicin, tetracycline and cephalothin for *E. coli* strains and erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, vancomycin, oxacillin and penicillin for *S. aureus* strains. The interpretation of results was performed after incubation at 35°C for 24h according to the criteria established by the CLSI (2009).

Statistical analyses were performed using the χ^2 test and Fisher's exact test.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of microbiological analysis of enteral feeding, water and powder module samples that were in disagreement with acceptable limits set forth by the legislation are presented in Table 1.

Mesophilic aerobic microorganisms

The counts of mesophilic aerobic microorganisms ranged from 1.2×10^2 to 5.0×10^2 cfu/mL with a mean of 3.1×10^2 cfu/mL. These counts denote unsatisfactory hygienic conditions of the product according to Brazilian legislation which established the limit of 1.0×10^2 cfu/mL.

The percentage of diet samples contaminated above the limits established by legislation in H1 and H2 (25.0% and 27.5% respectively), were higher than those presented by Lima *et al.* (2005), who found 20.0% of samples contaminated, ranging from 1.1×10^3 to 7.4×10^4 cfu/mL, and higher than the results presented by Simon *et al.* (2007), who found 16.2% of samples in violation of legislation. Oliveira *et al.* (2000) showed that the counts of mesophilic aerobic microorganisms in enteral diet samples analyzed from a hospital in Florianopolis, Brazil were higher than 10^4 cfu/mL.

Therefore, our results are concerning because the high counts of mesophilic microorganisms indicate the potential risk of pathogenic microorganisms being present.

Yeasts and Molds

Although the Brazilian legislation does not set standards for yeasts and molds, such tests were performed considering that along with the danger of deterioration, high yeast and mold counts would cause rejection of the product and health risks to patients due to the risk of mycotoxin production by certain mold species (Santos *et al.* 2008). In

five (6.2%) enteral diet samples from H1, the counts ranged from 5.2×10^1 to 6.1×10^1 cfu/mL. A powder module sample, also from H1 presented contamination with yeasts and molds of 1.5×10^1 cfu/g.

In addition to improper handling, the contamination by yeasts and molds could be partially attributed to the high-carbohydrate concentration normally present in the diet formulation (Santos *et al.* 2008).

These results indicate a need to improve the hygienic and sanitary control of the food-processing environment to prevent the poor quality of the diets.

Coliforms and *E. coli*

According to the results, coliform was the group most frequently isolated from the samples from both hospitals, especially in the enteral diet samples. Forty-seven (58.8%) and 30 (37.5%) of the enteral feeding samples collected from H1 and H2, respectively, tested positive for coliforms (Table 1). Counts ranged from 6.0 cfu/mL to 4.5×10^2 cfu/mL in H1 samples and from 7.0 cfu/mL to 7.5×10^3 cfu/mL in H2 samples. Contamination by *E. coli* was present in one (1.2%) of 80 enteral diet samples collected from H1 and in two (2.5%) of 80 samples collected from H2 (Table 1). In the H1 samples, coliforms were present in samples of water and the powder module (Table 1). H1 samples showed significantly higher contamination with coliforms than H2 samples.

Previous studies have also demonstrated contamination of enteral feeding by coliforms. Research conducted in the Philippines (Sullivan *et al.* 2001) found 38.0% of the samples contaminated by these microorganisms. In Brazil, studies have shown contamination levels slightly lower than those found in the current study. Lima *et al.* (2005) detected contamination in 25.0% of enteral feeding samples analyzed in a hospital in Natal/RN. Simon *et al.* (2007) reported contamination in 12.5% of enteral feeding samples evaluated at the Clinic Hospital of Porto Alegre/RS. The lower contamination reported by those authors could be attributed to Good Manufacturing Practices previously adopted by this hospital, which certainly are responsible for quality improvements in the diet handling environment.

A higher percentage of *E. coli* contamination was observed in Costa Rica, with values between 12.0 and 31.0% in enteral formulations (Arias *et al.* 2003). Lima *et al.* (2005) determined that 10.0% of the samples in Natal/RN were contaminated with *E. coli*. In samples collected in the Clinic Hospital of Porto Alegre/RS, Brazil, there was no evidence of *E. coli* contamination (Simon *et al.* 2007).

Concerning the water analysis, Sousa and Campos (2003) found no contamination by coliforms or *E.coli* in the water used for the diets formulation in Belém/PA.

The results of the food handler's hand and nasal cavity colonization are shown in Table 2. Among the 10 handlers from H1, seven (70.0%) presented *E. coli* at least twice on their hands and/or nasal cavity during the period of the study. All four food handlers evaluated (100.0%) from H2 were colonized more than twice on their hands and/or nasal cavity during the study. There was no significant difference in handler colonization levels between the two hospitals.

There was also no significant difference in the level of hand colonization by coliforms in the hospitals. Similar percentages were found by Sousa and Campos (2003) in Belém/PA, and by Santos *et al.* (2004) in João Pessoa/PB, where 66.7% and 60.0% of the food handlers' hands, respectively, were contaminated by coliforms.

This study draws attention to the isolation of higher percentages of *E. coli* in the food handlers' nasal cavities (8.6% and 22.5%) than on their hands (1.4% and 2.5%) in H1 and H2, respectively. Considering that the samples were obtained over the course of a year in H1 and a month in H2 and that *E. coli* was isolated in several handlers and several times in the same handler, we can infer that in some situations the contamination of the nasal site, unusual for this bacterium, was not transient and therefore represents persistent colonization. This result is troublesome because pathogenic strains can eventually reach the environment, the ingredients and the enteral feeding due to sanitary failures during formulation of the enteral diet or its administration to patients. The presence of *E. coli* was significantly higher in the food handlers' nasal cavities at H2 than at H1.

The presence of coliforms and *E. coli* in the food environment indicates inadequate sanitary conditions and contamination of fecal origin, as well as the risk of the presence of pathogenic strains of *E. coli* (Lima *et al.* 2005). Therefore, by analyzing the results of this study, we conclude that the presence of these bacteria in the enteral diet, water and food handler samples has great epidemiological importance, mainly because this product is offered specially to immunocompromised patients, who are more likely to be susceptible to infections.

In addition to the microbiological analysis of samples, an assessment of some aspects related to the handlers, utensils and staging environment was also performed.

Results showed improper conditions of hygiene and structure, demonstrating that these factors can also contribute to increase the probable risk of diet contamination.

S. aureus

Of the 160 enteral diet, water and powder module samples collected in H1, *S. aureus* was present in only two enteral diets samples (1.2%). All 160 enteral feeding, water and module samples collected from H2 tested negative for this microorganism. These results agree with those obtained by Sousa and Campos (2003), Lima *et al.* (2005) and Simon *et al.* (2007), who found that all enteral diet samples analyzed were negative for *S. aureus*. Concerning the food handlers, this study demonstrates a significant difference between the hospitals evaluated. At H1, 13 samples (9.3%), 11 of which were obtained from nasal cavities, were positive for *S. aureus*. At H2, there was no positive sample for this microorganism. Santos *et al.* (2004) found that 40.0% of samples in João Pessoa/PB were positive for *S. aureus*. In patients debilitated by chronic diseases, physical trauma or immunosuppression, this organism can cause severe infections (Trabulsi *et al.* 2002).

In addition to representing improper manipulation by handlers, the presence of *S. aureus* also represents a potential risk of staphylococcal enterotoxin production by toxigenic strains. This risk is of great importance in public health, considering that the enterotoxin is detectable in foods containing *S. aureus* at levels of 10^3 cfu/g (Balaban and Rasooly 2000).

Antimicrobial susceptibility testing of *E. coli*

The antimicrobial susceptibility of the 20 *E. coli* isolates from diet and personnel samples from both hospitals, was examined by the standard disk diffusion method (Table 3). In H1 samples all isolates were susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, cephalothin, gentamicin, ceftazidime and tetracycline. Ampicillin resistance was observed in six (75.0%) isolates. In H2 samples all isolates were susceptible to trimethoprim, ciprofloxacin, gentamicin and ceftazidime. Cephalothin resistance was observed in 11 isolates (91.7%), and tetracycline and ampicillin resistance was observed in all 12 isolates (100.0%). Intermediate cephalothin sensitivity was observed in one isolate (8.3%).

In a similar study, Arias *et al.* (2000) found that 100.0% of Gram-negative strains isolated from enteral feeding samples in a hospital in Costa Rica were susceptible to ciprofloxacin and 25.3% were resistant to cephalothin

The use of antibiogram allowed the observation that 12 isolates (100.0%) from H2 were resistant to two or more of the antibiotics tested. This increased potential for resistance in the population of susceptible isolates should be considered in monitoring actions to reduce resistance to antibiotics in the food chain (Klein and Bulte 2003).

The results of susceptibility testing of the 20 strains of *E. coli* isolated from both hospitals allowed the classification of these isolates into four different phenotypic profiles (A - D), as shown in Table 3.

Phenotypes A and C contained microorganisms with the same phenotypic profile from food handler and diet samples, suggesting that in these cases, the source of microorganisms for the final product could be the handlers. We observed handlers colonized by bacteria with the same phenotype on different days (phenotype B of H1 and C of H2), suggesting persistence of colonization. It was also possible to infer that during the study period, the same handler carried different strains of *E. coli*, as observed in phenotypes A and B of H1 and C and D of H2. Moreover, the same profile of susceptibility was observed in different handlers (phenotypes B and C). This fact emphasizes the risk of bacterial transfer both among handlers and among handlers and food products.

Antimicrobial susceptibility testing of *S. aureus*

The antimicrobial susceptibility of the 15 *S. aureus* strains isolated from diet and personnel samples from H1 was examined by the standard disk diffusion method. Table 4 summarizes the antimicrobial susceptibility profiles obtained. Resistance to penicillin was the most common resistance pattern, with ten isolates (66.7%) showing resistance to this antibiotic. Erythromycin was the next most common resistance: with nine isolates (60.0%) displayed resistance, and six isolates (40.0%) showed intermediate sensitivity. Additionally, four isolates (26.7%) were resistant to tetracycline. All *S. aureus* isolates were sensitive to oxacillin, vancomycin, ciprofloxacin and gentamicin. Martins *et al.* (2007) found that 100% of *S. aureus* strains isolated from enteral diet and handler samples were resistant to tetracycline and 90% were resistant to erythromycin.

The use of antibiogram allowed the observation that *S. aureus* strains were resistant to antibiotics in 13 (86.7%) of 15 samples tested, seven of which (46.7%) were resistant to more than one antibiotic (Table 4). These data highlight the compromised safety of the diets production and also represent the risks to patients who are health-debilitated. In bacteria multi-drug resistance correlates with virulence (Carmo *et al.*

2002). The spread of resistant microorganisms by food and/or food handlers is worrisome and should be avoided in the production chain.

The emergence of strains that are resistant to antimicrobial agents has become a major public health concern all over the world. The abuse of antibiotic therapy in both veterinary and human medicine, especially in developing countries, coupled with current knowledge of the spread of antibiotic resistance among various bacteria makes it essential to monitor the susceptibilities of known pathogenic bacteria to antibiotics.

The susceptibility testing performed on the 15 *S. aureus* strains allowed classification of the strains into six different phenotypic profiles (A - F), as shown in Table 4.

Phenotypes A, C, D and F contain three samples each. Seven strains were resistant to more than one antibiotic (phenotypes D, E and F). The antibiogram provided important information regarding the susceptibility of the strains and the potential risk of the spread of resistant strains. However, it was not possible to establish that the source of *S. aureus* in the diet samples was the handler because the strains found were considered phenotypically different.

Regarding the handlers, we observed phenotypic similarity among strains isolated from the same origin on different days (phenotype A: handler 8, days 7 and 9; phenotype C: handler 8, days 21 and 31; phenotype D: handler 4, days 2, 15 and 27; and phenotype F: handler 1, days 1 and 3), suggesting the persistence of colonization for several months in some cases. Acco *et al.* (2003) studied the occurrence of multiple strains of *S. aureus* colonizing the nasal cavity of food handlers and detected persistent colonization in 30% of handlers.

Phenotypic profiles were also found in different handlers on different days (phenotype A: handlers 8 and 9, days 7 and 9; and phenotype F: handlers 1 and 2, days 1 and 3), indicating the possibility of bacterial transmission among people in the work environment. We also observed the same phenotypic profile in strains isolated from the hands and nose of the same handler on the same day (phenotype C, handler 8, day 21), demonstrating that hygienic practices may be overlooked: these poor hygienic practices could facilitate the transmission of bacteria to different places, where they could contaminate equipment, utensils and food with which they come into contact.

Some bacterial typing methods have been used to compare strains and identify mechanisms of transmission and sources of contamination for several pathogenic bacteria. Among these methods, the antibiogram has been used for being easy,

accessible, and for permitting a strict quality control and low costs. It also affords the knowledge of microbial resistance of the bacteria. However, the antibiogram has limitations, such as low discriminatory power and the fact that its results must be interpreted in combination with other parameters (Jensen *et al.* 2006).

The results of this study demonstrate the importance of monitoring the occurrence of antimicrobial resistance. Prevention and control of the problem of multi-resistance include mainly educational actions, the rational use of antimicrobials, surveillance of hospital strains and sensitivity profiling. Furthermore, it is necessary that the national programs of control are related to the international regulations to limit the selection of resistant bacteria in this way, it can be ensured that patients are not exposed to unnecessary dangers in relation to antibiotic-resistant bacteria in consumed food (Jensen *et al.* 2006).

CONCLUSIONS

The results obtained in this study indicate that most of the enteral diet samples evaluated showed inadequate sanitary conditions, highlighting the need to implement an efficient system of quality control in the areas of handling enteral nutrition, including good manufacturing practices and standard operational procedures, as established by the health legislation.

The detection of pathogens and other microorganisms in the samples suggests that the consumption of these enteral diets may represent potential risks to patient health, especially considering that antimicrobial resistance was found.

This work also showed, through phenotypic classification, that manual contact is a source of great significance for enteral feeding contamination in the hospital environment, and these data emphasize the importance of properly training food handlers. Such actions can lead to the prevention of infections related to the use of this type of diet therapy.

REFERENCES

ACCO, M., FERREIRA, F.S., HENRIQUE, J.A.P., TONDO, E.C. 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol.* **20**, 489-493.

- APHA (American Public Health Association). 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. (F.P. Downes and K. Ito, eds.) 4th ed. 676p. American Public Health Association, Washington, DC.
- ARIAS, M.L., MONGE, R., ARTAVIA, J., GONZÁLEZ, P. 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of Gram negative bacteria isolated from enteral feeding. *Rev. Biomed.*, **11**, 169-174.
- ARIAS, M.L., MONGE, R., CHAVEZ, C. 2003. Microbiological contamination of enteral feeding solutions used in Costa Rican Hospitals. *Arch. Latinoam. Nutr.*, **53**, 277-281.
- BALABAN, N., RASOOLY, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, **61**, 1-10.
- BRASIL, 2000. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 63 de 06 de julho de 2000. Regulamento técnico para terapia de nutrição enteral. Diário Oficial da União, Brasília 07 de julho de 2000.
- BRASIL. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). 2001. Resolução RDC nº12, de 02.01.01: Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan. 2001. Brasil. Available in http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm (accessed May 03, 2008).
- CARMO, L.S., DIAS, R.S., LINARDI, V.R., SENA, M.J., SANTOS, A.A., FARIA, M.E., PENA, E.C., JETT, M., HENEINE, G. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, **19**, 9-14.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Fifteenth informational supplement M100-S19*. pp. 26-138, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- JENSEN, L.B., HASMAN, H., AGERSO, Y., EMBORG, H.D., AARESTRUP, F.M. 2006. First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL, carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.*, **57**, 793-794.
- KLEIN, G., BULTE, M. 2003. Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiol.*, **20**, 27-33.

- LIMA, A.R.C., BARROS, L.M., ROSA, M.S., CARDONHA, A.M.S., DANTAS, M.A.M. 2005. Avaliação microbiológica de dietas enterais manipuladas em um hospital. *Acta Cir. Bras.*, **20**, 27-30.
- MARTINS, J.F.L., MARTINS, A.D.O., MILAGRES, R.C.R.M., ANDRADE, N.J. 2007. Resistência a antibióticos de *Staphylococcus aureus* isolados de dietas enterais em um hospital público de Minas Gerais. *Semina.*, **28**, 9-14.
- MAURÍCIO, A.A., GENTA, T.M.S., MATIOLI, G. 2005. Verificação das boas práticas de preparação e análise microbiológica de dieta enteral em serviço de nutrição e dietética de hospital privado. *Acta Sci. Health Sci.*, **27**, 157-161.
- OLIVEIRA, M.H., BONELLI, R., AIDOO, K.E., BATISTA, C.R.V. 2000. Microbiological quality of reconstituted enteral formulations used in hospitals. *Nutrition*, **16**, 729-733.
- SANTOS, B.H.C., SOUZA, E.L., SOUSA, C.P., SERRÃO, L.H., AMARAL, W.C. 2004. Manipuladores como causas potenciais de contaminação microbiana de alimento enteral. *Informa*, **15**, 71-73.
- SANTOS, C.A.A., COELHO, A.F.S., CARREIRO, C.C. 2008. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **28**, 913-915.
- SIMON, M.I.S.S., FREIMULLER, S.; TONDO, E. C.; RIBEIRO, A. S.; DREHMER, M. 2007. Qualidade microbiológica e temperatura de dietas enterais antes e após implantação do sistema de análise de perigo e pontos críticos de controle. *Rev. Nutr.*, **20**, 139-148.
- SOUSA, C.L., CAMPOS, G.D. 2003. Condições higiênico-sanitárias de uma dieta hospitalar. *Rev. Nutr.* **16**, 127-134.
- SULLIVAN, M.M., SORREDA-ESGUERRA, P., SANTOS, E.E., PLATON, B.G., CASTRO, C.G., IDRISALMAN, E.R., *et al.* 2001. Bacterial contamination of blenderized whole food and commercial enteral tube feedings in the Philippines. *J. Hosp. Infect.*, **49**, 268-273.
- TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. 2002. *Microbiologia*. 3ªed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2002.

TABLE 1. MICROBIOLOGICAL RESULTS OF ENTERAL FEEDING, MODULE, AND WATER ABOVE THE LIMITS ESTABLISHED BY BRAZILIAN LEGISLATION, IN THE CENTRAL REGION OF BRAZIL, 2008.

Collected samples		Diets	Water	Powder Module	Total
H1		80	40	40	160
H2		80	40	40	160
DBL*		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Mesophilic aerobic	H1	20 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	20 (12,5)
	H2	22 (27,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	22 (13,8)
	p	0,719	NC	NC	0,74
Yeasts and Molds	H1	5 (6,2)	0 (0,0)	1 (2,5)	6 (3,8)
	H2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	p	0,027	NC	0,50	0,014
Coliforms	H1	47 (58,8)	6 (15,0)	2 (5,0)	55 (34,4)
	H2	30 (37,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	30 (18,8)
	p	0,007	0,010	0,152	0,001
<i>E. coli</i>	H1	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,6)
	H2	2 (2,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,2)
	p	0,50	NC	NC	0,5
<i>S. aureus</i>	H1	2 (2,5)	NA	0 (0,0)	2 (1,2)
	H2	0 (0,0)	NA	0 (0,0)	0 (0,0)
	p	0,24	NC	NC	0,25

*DBL = Disaccording to Brazilian Legislation

p< 0.05 = statistically significant

NC = Not calculated

NA = Not Applicable

Brazilian standards according to legislation:

Diets (Brasil, 2000): Mesophilic microorganisms - $<10^3$ cfu/mL; Coliforms, *E. coli* and *S. aureus* - <3 cfu/mL.

Water (Brasil, 2001): Mesophilic microorganisms - $<5.0 \times 10^2$ cfu/mL; Coliforms – absent.

Powder module (Brasil, 2001): Mesophilic microorganisms - $<10^3$ cfu/g; Coliforms <3 cfu/g and *S. aureus* - $<5.0 \times 10^1$ cfu/g

TABLE 2. HANDS AND NASAL COLONIZATION OF FOOD HANDLERS WORKING IN PUBLIC HOSPITALS IN THE CENTRAL REGION OF BRAZIL, 2008.

Collected samples		Hands	Nares	Total
H1		70	70	140
H2		40	40	80
Positive samples		n (%)	n (%)	n (%)
Coliforms	H1	16 (22,9)	8 (11,4)	24 (17,1)
	H2	13 (32,5)	16 (40,0)	29 (36,2)
	p	0,26	0,004	0,45
<i>E. coli</i>	H1	1 (1,4)	6 (8,6)	7 (5,0)
	H2	1 (2,5)	9 (22,5)	10 (12,5)
	p	0,59	0,043	0,454
<i>S. aureus</i>	H1	2 (2,9)	11 (15,7)	13 (9,3)
	H2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	p	0,33	0,001	0,002

p< 0.05 = statistically significant

TABLE 3. *E. COLI* PHENOTYPES BASED ON THE ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STRAINS ISOLATED FROM PUBLIC HOSPITALS IN THE CENTRAL REGION OF BRAZIL, 2008.

Samples ^a	Susceptibility profile ^b	Phenotype
H1: F _{5nd7} , D _{17d1}	SSSSSSS	A
H1: F _{2nd1} , F _{5nd5} , F _{5nd8} , F _{5nd10} , F _{5nd11} , F _{5hd11}	SSSSSSR	B
H2: F _{1nd7} , F _{3nd4} , F _{3hd6} , F _{3nd6} , F _{3nd8} , F _{3nd10} , F _{3nd12} , F _{3nd16} , F _{3nd18} , D ₇₍₁₎ , D ₇₍₂₎	SSRSSRR	C
H2: F _{3nd20}	SSISSRR	D

^a H – Hospital, F – Food handler; n – nasal cavity; h – hand; d – day; D – diet

^b R - Resistance, I - intermediate susceptibility and S - susceptibility. Antibiotics are arranged in the following sequence: trimethoprim, ciprofloxacin, cephalothin, gentamicin, ceftazidime, tetracycline, and ampicillin

TABLE 4. PHENOTYPE CHARACTERIZATION BASED ON THE ANTIBIOGRAM OF *S. AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM PUBLIC HOSPITALS IN THE CENTRAL REGION OF BRAZIL, 2008.

Samples ^a	Susceptibility profile ^b	Phenotype
(H1) F _{8nd7} , F _{8nd9} , F _{9hd9}	SRSSSIS	A
(H1) D _{2d1} , D _{2d2}	SSSSSIS	B
(H1) F _{8hd21} , F _{8nd21} , F _{8nd31}	SSSSSRS	C
(H1) F _{4nd2} , F _{4nd15} , F _{4nd27}	SRSSSRS	D
(H1) F _{8nd15}	SRSRSIS	E
(H1) F _{1nd1} , F _{1nd3} , F _{2nd3} ,	SRSRSRS	F

H1 – hospital 1; F – food handler; n – nasal cavity; h – hand; D – diet; d – day

^a Resistance (R), intermediate susceptibility (I) and susceptibility (S). Antibiotics are arranged in the following sequence: oxacillin, penicillin, vancomycin, tetracycline, ciprofloxacin, erythromycin, and gentamicin.

ARTIGO 2

Molecular Epidemiology of Microorganisms Isolated From Food Workers and Enteral Feeding of Public Hospitals

Este artigo foi publicado na Journal of Food Science

(ANEXO 6)

Molecular Epidemiology of Microorganisms Isolated From Food Workers and Enteral Feeding of Public Hospitals

Liana J. Borges^{1*}; Maria Raquel H. Campos², Juliana L. Cardoso¹, Maria Cláudia D. P. B. André¹; Álvaro B. Serafini³

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Brasil
(Rua 235, s/nº, Setor. Universitário, Goiânia - Goiás – Brasil, CEP: 74605-050)

² Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Brasil (Rua 227 Qd. 68 s/nº -
Setor Leste Universitário, Goiânia – Goiás - Brasil, CEP: 74.605-080)

³ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil (Centro de
Ciências da Saúde - Campus Universitário – Trindade, Florianópolis – SC – Brasil,
CEP: 88040-900)

Direct inquiries to author Liana J. Borges (e-mail: liana_jayme@yahoo.com.br);
Adress: Avenida 136, nº 515, aptº 1102, Residencial DJ. Oliveira, Setor Marista,
Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74180-040; phone number: 55 62 3281-7172; fax number:
55 62 3209-6363

Short title: Bacterial contamination of enteral diets . . .

Journal section: Food Microbiology and Safety

ABSTRACT

This study aimed to compare strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from food workers and enteral diets samples obtained from two public hospitals (H1/H2) in Goiania/Goias, Brazil, by the means of antibiogram and PFGE. In the H1, strains of *S. aureus* were present in two enteral diets samples and in 13 food workers swabs. Strains of *E. coli* were found in a enteral diet sample from H1 and in two enteral diet samples from H2 and in six food workers swabs in the H1 and in 12 food workers swabs from H2. According to the antibiogram, the six susceptibility profiles (A-F) of 15 *S. aureus* strains colonizing personnel and enteral feeding did not allowed the identification of the probable source of diets contamination. All 20 *E. coli* strains isolated from the H1 and H2 were grouped in four phenotypic profiles (A-D). The phenotypes A (H1) and C (H2) showed the same profile for microorganisms isolated from handlers and diets, suggesting more phenotypic similarity among these samples. PFGE genotyping showed that *S. aureus* isolates from diets were related to a single strain isolated from food worker suggesting that in this case the reason of the diets contamination may be a result of food handling. The food worker appears to be the most probable source of *E. coli* contamination for enteral feeding from H2. This fact emphasizes the food workers as a risk of bacterial transmission for the diets and that the diets chain production must be controlled.

Key words: antimicrobial activity, molecular biology, food microbiology, food safety, foodborne pathogens.

PRACTICAL APPLICATIONS

The work emphasizes the importance of monitoring the enteral diet microbiological quality and the factors associated to its contamination. The study highlights the use of molecular biology as an instrument to correlate strains in order to determine the origin of the final product contamination.

INTRODUCTION

Enteral nutrition (EN) is defined as food for special purposes, with controlled intake of nutrients with defined or estimated composition, which is specially formulated and designed for use by oral or probe delivery. EN is used exclusively or partially to replace or supplement oral feeding in patients who may or may not be undernourished depending on their nutritional needs, in hospital environments or homes (Brasil 2000). These diets can be administered through open or closed system. In the open system, the formula can require manipulation prior to its administration.

The EN is the most common and preferred modality for providing nutritional support to hospital patients with a functional gastrointestinal tract that can not satisfy their nutritional requirements, due to an inadequate oral intake of energy and nutrients (Gabor and others 2005, Kreymann and others 2005, Barrett and others 2009).

Complications occurring during EN have been considered rare and essentially non-infectious (Kondrup and others 2002). Nevertheless, markedly contaminated enteral diet, containing 10^3 to 10^9 Gram negative bacilli/mL, has been reported to cause, not only diarrhea, but also sepsis, pneumonia, and urinary tract infections (Pancorbo-Hidalgo and others 2001). Also, considerable evidence indicates that enteral feeding contaminated with bacteria may be the cause of nosocomial infection (Pancorbo-Hidalgo and others 2001).

Several factors contribute to the development of these infections in hospitalized patients, including the failure of the digestive tract resistance to bacteria acquired orally in response of stress, severe illness and antibiotic treatment, non-sterile ingredients, manipulation, long time of supplementation, prolonged use or reuse of the infusion system, and other equipment used in their preparation (Arias and others 2003).

S. aureus and *E. coli* strains may vary considerably in virulence and epidemiological potential. To control the spread of these microorganisms, the sources of contamination and the mechanisms of transmission must be identified (Zadoks and others 2000). The differentiation of microorganisms obtained from the same environments by classical typing methods is very useful, contributing to the investigation of sources of contamination. For instance, antibiotic susceptibility testing (AST) can be used. This test is widely available, rigorously quality-controlled, typically easily performed and relatively inexpensive (Arbeit 1999).

The genetic heterogeneity in natural populations of *S. aureus* and *E. coli* should be explored to trace the *S. aureus* and *E. coli* spread in human, animal and contaminated food (Lange and others 1999). To investigate the DNA heterogeneity, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is the recommended method for epidemiological typing of *S. aureus* and *E. coli* isolated from foods and food workers (Zadoks and others 2000, 2002, Jørgensen and others 2005).

The aims of our study were to characterize *S. aureus* and *E. coli* strains isolated from enteral diets (a kind of enteral nutrition) administered via nasogastric tube, water, power module and the human nasal cavity and hands, by means of antibiogram and PFGE analysis, in order to investigate any relationship among the strains, and the possible sources of enteral diets contamination.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Samples were collected from two public hospitals in the Central Region of Brazil. In hospital 1 (H1) from October 2007 to November 2008 and in the hospital 2 (H2), from November to December/2008, a total of 80 samples of enteral diets were

collected in sterile vials from each hospital. Forty samples of 50g module powder and 40 samples of water used in the diets formula were also collected from both hospitals. Using sterile swabs, 70 samples of the nasal cavity and 70 samples of ten food workers' hands involved in the diets preparation were collected in H1 and 40 samples of the nasal cavity and 40 samples of four food workers' hands were collected in H2. The food workers blended the powder module and water and bottled the diet for latter administration to patients. It was observed that no food worker wore gloves during diet preparation.

The study protocol was approved by the Ethical Committee from each hospital and the participants gave informed consent. During each visit, hands and nasal cavity samples were collected from the handlers who were working on that day. The swabs were immediately placed in Brain Heart Infusion (BHI) broth. The water, enteral diet and module powder samples were collected in sterile plastic vials supplied by the hospitals. All collected samples were transported in an isothermal box with ice to the Food Control Laboratory of the Goias Federal University and immediately analyzed.

Microbiological procedures

The enteral diets, water and module powder samples were analyzed according to Brazilian legislation (Brasil 2001, 2000). The hands and nasal cavities swabs seeded in BHI broth were incubated at 37°C for 24 h, streaked on mannitol salt agar (MS) and eosin methylene blue (EMB) agar and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Based on colony morphology, Gram staining and biochemical tests the colonies were identified as *S. aureus* and *E. coli* (APHA 2001). The isolates were stored at -80°C in tryptic soy broth (TSB) with 20.0% glycerol awaiting further analyses.

Antibiotic susceptibility test (AST)

The susceptibility of all isolates to different antimicrobials was tested by the disk-agar diffusion method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2007). For *S. aureus* susceptibility test the antibiotic impregnated disks used were erythromycin (15µg), ciprofloxacin (5µg), tetracycline (30µg), gentamicin (10µg), vancomycin (30µg), oxacillin (1µg), and penicillin (10UI). For *E. coli* susceptibility test the antibiotic impregnated disks used were trimethoprim (1.25µg), ciprofloxacin (5µg), ampicillin (10µg), gentamicin (10µg), tetracycline (30µg), and cephalothin (30µg). Plates were inoculated and zone sizes were interpreted by the CLSI (2007) standards. The results of these tests were recorded after 18-24h of incubation at 35°C.

For typing purposes, a code profile was established based on antibiotic susceptibility of each isolate. Resistance was coded as “R”, intermediary sensitivity as “I”, and sensitivity as “S”.

Pulsed field gel electrophoresis

The genetic patterns of *S. aureus* and *E. coli* isolates was carried out by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of digested DNA, using a CHEF DRII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) following the method of Chung and others (2000) (*S. aureus*) and Ribot and others (2006) (*E. coli*), with modifications.

S. aureus

A single isolated colony was inoculated in 5mL of TSB broth (Oxoid) and incubated at 37°C for 16–18 h. Five hundred microliters of the overnight culture were pelleted and resuspended in 200µL of cell suspension buffer (PIV; 10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1M NaCl). The cell concentration was adjusted to 5 OD_{620nm} with a spectrophotometer. The plugs made of 100µL of cell suspension and 100µL of 1.5%

low melting point (LMP) agarose were lysed in 0.5mL of EC buffer (6mM Tris–HCl [pH 8.0], 1M NaCl, 100mM EDTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% Sarkosyl) with 50µg/mL RNase, 100µg/mL lysozyme and 50µg/mL lysostaphin for 5h at 37°C, followed by incubation at 50°C overnight in 500µL of proteinase K (PK) buffer (0.5M EDTA, 1% sarkosyl) and PK (1mg/mL). Plugs were washed five times with 10mL of Tris EDTA Buffer (TE; 10mM Tris, 1mM EDTA [pH 8.0]) for 30 min each. The plugs were restricted with a mixture of 50µL of 1X restriction buffer and 20U of *Sma*I restriction enzyme overnight at 25°C. Digests of DNA were separated for 23h by PFGE using 1% agarose for PFGE running gell (Sigma®) in 150 mL of 0.5X TBE buffer under following conditions: 14°C, 6V/cm, 5–35 pulse times, with a CHEF DRII (BioRad®). A lambda ladder molecular weight marker (BioRad®) and NCTC 8325 strains were included in each gel. Gels were stained with ethidium bromide (40µg/mL) and then photographed under UV light.

E. coli

Bacteria were grown on tryptic soy agar (TSA) at 35-37°C for 14-16h. The cells were suspended in 2mL of Cell Suspension Buffer (CSB, 100mM Tris, 100mM EDTA [pH8.0]) and the concentration was adjusted to absorbance values of approximately 1.3-1.4 measured at a wavelength of 610nm with a spectrophotometer. A 200µL aliquot of adjusted cell suspension were mixed with 20µL of proteinase K (20mg/mL) and an equal volume of 1.0% agarose for PFGE running gell (Sigma) and 1.0% sodium dodecyl sulfate (SDS) prepared in Tris EDTA buffer (TE; 10mM Tris, 1mM EDTA [pH 8.0]) was added to the cell mixture and plugs were made. The plugs were placed in tubes containing 5mL of Cell Lysis Buffer (CLB; 50mM Tris, 50mM EDTA [pH 8.0]; 1.0% sarcosyl; 0.6mg/mL proteinase K) and incubated in a 54°C shaking water bath for 2h. The plugs were rinsed with 10mL of pre-heated (50°C) water

and then washed four times with sterile TE buffer pre-heated to 50°C in a 50°C water bath with agitation. The plugs were restricted with a mixture of 100 µL of 1X restriction buffer and 40U of *Xba*I restriction enzyme for at least, 2h at 37°C. Digests of DNA were separated for 19 h by PFGE using 1.0% agarose for PFGE running gell (Sigma®) in 150 mL of 0.5X TBE buffer under following conditions: 14°C, initial switch time value of 2.16 sec, final switch time of 55.17 sec at a gradient of 6V/cm, with a CHEF DRII (Bio Rad®). A lambda ladder molecular weight marker (Bio-Rad®) was included in each gel. Gels were stained with ethidium bromide (40µg/mL) and then photographed under UV light.

Isolates of *S. aureus* and *E. coli* were placed in groups of identical or related strains by comparing the banding patterns produced, using a combination of photographic visual inspection and computer analysis (BioNumerics, v. 5.0; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A pulsotype (PT) was defined as a unique electrophoretic banding pattern. Isolates with identical restriction profiles were assigned as the same type and identified with a capital letter. PTs with one to three differences were considered closely related and were assigned as subtypes (ST) indicated with a numeral suffix. Isolates with more than three differences were considered to be different types (Tenover and others 1995). Patterns were clustered by unweighted-pair group method (UPGMA) and dendrograms were generated from a similarity matrix calculated using the Dice similarity coefficient. PFGE clusters were defined as isolates with a similarity of 80% or higher on the dendrogram and were identified by arabic numerals.

RESULTS AND DISCUSSION

Fifteen *S. aureus* and eighth *E. coli* isolates were obtained from diets and food workers of H1 and 12 *E. coli* isolates were obtained from the same samples of H2

(Table 1). The *S. aureus* strains were isolated from five (50.0%) of ten food workers investigated from H1. A total of 140 samples, 70 from noses and 70 from hands, were collected and *S. aureus* were recovered from 11 (15.7%) and two (2.9%) of those samples, respectively (Table 1). On one occasion (worker n° 8), *S. aureus* was recovered from both hand and nose samples at the same time.

Seven *E. coli* strains were obtained from food workers of H1 being six (8.6%) from 70 nasal swabs and one (1.4%) from 70 hands swabs. Ten *E. coli* strains were isolated from food workers of H2, nine of them (22.5%) from noses and one of them (2.5%) from hands (Table 1). On two occasions (worker n° 5 from H1, worker n° 3 from H2), *E. coli* was recovered from both hand and nose samples at the same time.

From 80 diets samples collected in H1, *S. aureus* strains were recovered from two (2.5%) of them. There was no *S. aureus* strain isolated from samples collected in H2. *E. coli* was obtained from three diets samples being one from H1 and two from H2 (Table 1).

Food workers play an important role in food safety and can also contribute to the transmission of food poisoning, since they may introduce pathogens in the food during production, processing, distribution and handling (Angelillo and others 2000). According to Kennedy and others (2000), 15.0% of healthy adults harbor *S. aureus* persistently in the nose. In this work, we found 36% of food workers carrying *S. aureus* on their nares and/or hands, in both hospitals. These results could be attributed to the hospital environment where the work took place that allows greater exposition to the bacterial agents. Due to economical and social difficulties that Brazil presently faces, the turnover among food workers is very high, resulting in frequent food manipulation without proper training of personnel in Good Manufacturing Practices (GMP), increasing the possibility of contamination. Asymptomatic carriers play an important

role in the maintenance and spread of these microorganisms, especially people in professional activities related to public health or food processing (Araújo and others 2002).

Although a few enteral diets samples presented contamination, they are considered important risk factors for hospitals acquired infections such as diarrhea, pneumonia and sepsis. Enteral feeding constitutes an excellent environment for microorganisms' proliferation, due to its composition of macro and micro-nutrients, pH around 7.0 and high water activity. In addition patients who need enteral nutrition are under critical conditions, malnourished with difficulties in preventing microbial organic aggression, whether by failure of intestinal barrier, or systemic immunosuppression (Waitzberg 2001).

Table 1. *S. aureus* and *E. coli* isolated from samples of two public hospitals in Central region, Brazil, 2008.

Source		Collected samples	Positive samples			
			<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
			N ^o	%	N ^o	%
Diets	H1	80	2	2.5	1	1.2
	H2	80	0	0.0	2	2.5
Powder Module	H1	40	0	0.0	0	0.0
	H2	40	0	0.0	0	0.0
Water	H1	40	0	0.0	0	0.0
	H2	40	0	0.0	0	0.0
Food workers' nares	H1	70	11	15.7	6	8.6
	H2	40	0	0.0	9	22.5
Food workers' hands	H1	70	2	2.9	1	1.4
	H2	40	0	0.0	1	2.5

Antibiotic susceptibility test (AST)

S. aureus

The antimicrobial susceptibility of 15 *S. aureus* isolates is shown in Table 2. All isolates were susceptible to oxacillin, vancomycin, ciprofloxacin, and gentamicin. The resistance pattern was observed in 10 isolates (66.7%) for penicillin, in 04 isolates (26.7%) for tetracycline and in nine isolates (60.0%) for erythromycin. Six isolates (40.0%) presented intermediate susceptibility to erythromycin (Table 2). Martins and others (2007) found higher levels of resistance among strains isolated from enteral feeding and food workers being 100% for tetracycline and 90.0% for erythromycin.

The typing by the AST of all 15 positive isolates showed six different phenotype profiles (A-F, Table 2). Our data showed that 46.7% of positive samples (phenotypes D, E and F) presented resistance to more than one antibiotic. The investigation of such strains in food processing environments is highly recommended, since horizontal transmission can occur (Tondo and others 2000). The spreading of multi-resistant *S. aureus* by food or food workers is a subject of concern and should be prevented in the food chain.

The food workers evaluated harbored strains with the same phenotype obtained in different sampling times (Phenotype B – food worker 8, days 21 and 31; Phenotype C – food worker 8, days 7 and 9; phenotype D – food worker 1, days 1 and 3 and Phenotype E – food worker 4, days 2, 15 and 27) suggesting the persistence of colonization for a few months in some occasions.

Similar results were found by Acco and others (2003) analyzing the occurrence of multiple strains of *S. aureus* on food workers noses where they detected persistent colonization in 30% of handlers.

Table 2. Antimicrobial susceptibility profiles of *S. aureus* strains isolated from samples of two public hospitals in Central region, Brazil, 2008.

Samples (H1) ^a	Susceptibility profile ^b	Phenotype
D ₂ d ₁ , D ₂ d ₂	SSSSSIS	A
F ₈ hd ₂₁ , F ₈ nd ₂₁ , F ₈ nd ₃₁	SSSSSRS	B
F ₈ nd ₇ , F ₈ nd ₉ , F ₉ hd ₉	SRSSSIS	C
F ₁ nd ₁ , F ₁ nd ₃ , F ₂ nd ₃	SRSRSR	D
F ₄ nd ₂ , F ₄ nd ₁₅ , F ₄ nd ₂₇	SRSSSRS	E
F ₈ nd ₁₅	SRSR	F

^a H1 – hospital 1; D – diet; d – day; F – food worker; n – nose; h - hand

^b Resistance (R), Intermediate sensitivity (I) and Sensitivity (S). Antibiotics are arranged in sequence: oxacillin, penicillin, vancomycin, tetracycline, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin.

The same phenotypes were identified in different food workers at different sampling times (Phenotype C – food workers 8 and 9, days 7 and 9; and phenotype D – food workers 1 and 2, days 1 and 3) indicating the possibility of cross-contamination among different handlers working together.

We observed that the same phenotype was found in strains isolated from hand and nose of the same food worker at the same time (phenotype B, food worker 8, day 21) showing that the hygiene practices can be neglected and this fact allow the bacterial transmission for different anatomic sites and from there to equipments, utensils and food which they have contact.

Food worker number eight presented multiple strains of *S. aureus* on his nose and hand (phenotype B, C and F) during the period of the study.

The susceptibility profiles of *S. aureus* strains colonising personnel and enteral nutrition, did not allow the identification of the probable source of food contamination, but enhanced the potential hazard of resistant strains dissemination.

E. coli

In the H1, all *E. coli* isolated strains were susceptible to ciprofloxacin, cephalotin, trimethoprim, gentamicin, ceftazidime and tetracycline. Resistance pattern was observed in six (75.0%) isolates to ampicillin. In H2 all isolated strains were susceptible to ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim and ceftazidime. Resistance pattern was observed in 11 isolates (91.7%) to cephalotin, 12 isolates (100,0%) to tetracycline and ampicillin. Intermediate susceptibility was observed in an isolate (8.3%) to cephalotin (Table 3).

In a similar study, Arias and others (2000), found that the gram-negative strains isolated from enteral diets at a hospital of Costa Rica were 100,0% susceptible to ciprofloxacin and 25.3% of the samples presented resistance to cephalotin.

According to antibiogram, 11 isolates (91.7%) from H2 were resistant to two or more antibiotics tested. The increase of resistance in isolated population should be considered in monitoring actions to reduce resistance to antibiotics in food chain (Klein and Bulte 2003).

Table 3. Antimicrobial susceptibility profiles of *E. coli* strains isolated from samples of two public hospitals in Central region, Brazil, 2008.

Samples ^a	Susceptibility profile ^b	Phenotype
H1: F _{5nd7} , D _{17d1}	SSSSSSS	A
H1: F _{2nd1} , F _{5nd5} , F _{5nd8} , F _{5nd10} , F _{5nd11} , F _{5hd11}	SSSSSSR	B
H2: F _{1nd7} , F _{3nd4} , F _{3hd6} , F _{3nd6} , F _{3nd8} , F _{3nd10} , F _{3nd12} , F _{3nd16} , F _{3nd18} , D ₇₍₁₎ , D ₇₍₂₎	SSRSSRR	C
H2: F _{3nd20}	SSISSRR	D

^a H1 – hospital 1; H2 – hospital 2; D – diet; d – day; F – food worker; n – nose; h – hand

^b Resistance (R), Intermediate sensitivity (I) and Sensitivity (S). Antibiotics are arranged in sequence: trimethoprim, ciprofloxacin, cephalotin, gentamicin, ceftazidime, tetracycline, ampicillin.

The analysis of susceptibility tests for 20 *E. coli* strains isolated in both hospitals allowed the classification into four different phenotypic profiles (A-D) as shown in Table 3.

The phenotypes A and C show strains isolated from handlers and diets with the same profile, suggesting that in these cases, the strains were closely related. It was observed handlers colonized by bacteria with the same phenotype in different sampling times (profile B of H1 and profile C of H2) showing the persistence of colonization. During the study, the same handler presented different strains of *E. coli*, as noted in the profiles A and B of H1 and profiles C and D of H2. In addition, the same susceptibility profile was observed on different handlers (phenotypes B and C).

In recent years, several bacterial typing methods have been used to compare strains and identify transmission mechanisms and sources of contamination of bacteria clinically important. Among these methods, the antibiogram has been used because its easy performance, accessibility, strict quality control and low cost. In addition, allows knowledge of microbial resistance of bacteria tested. However, the antibiogram has limitations, such as low discriminatory power, and their results should be interpreted in association with other parameters (Arbeit 1999).

The results of this study show the importance of monitoring the occurrence of antimicrobial resistance. Prevention and control of multi-resistance include mainly educational actions, the rational use of antimicrobials, surveillance of nosocomial strains and determination of susceptibility profile. Furthermore, it is necessary that the national control program establish relationship with the international regulations to limit the selection of resistant bacteria and thus ensure that patients are not exposed to unnecessary dangers like antibiotic-resistant bacteria in the food consumed (Jensen and others 2006).

Pulsed Field Gel Electrophoresis

The 15 *S. aureus* strains were typed using PFGE. The genetic analysis revealed seven different DNA banding patterns varying from 12 to 17 distinct bands, showing high genetic diversity among the samples. A dendrogram that included all patterns was constructed on the basis of the similarity levels (Fig. 1). A cut-off point of 80.0% of similarity was considered to define five clusters, numbered from 1 to 5. The 15 *S. aureus* isolates typed were assigned to five different pulsotypes (PT) and two subtypes (ST).

In this study, PFGE genotyping showed that the two *S. aureus* isolated from diets (cluster 1, PT A) were unrelated to strains isolated from food workers, except food worker number 8 that presented a strain closely related to diets strains (ST A1) suggesting that in this case the food worker could be the source of the diets contamination (Fig. 1).

Additionally, PFGE analysis also demonstrated the same patterns within different carriers (PT C and D) at different times, suggesting that there occurred transference of microorganisms among food workers through direct or indirect contact and consequently this is a potential source of diets contamination. This fact was previously demonstrated by other authors in healthy person, including personnel staff (Toshkova and others 1997). According to Kennedy and others (2000), the strains that are present in the nose can be transmitted to the hands and skin and may contaminate the air, water, soil, food and any area or object that has come into contact with the carrier increasing risks of food poisoning.

The isolates in the same individual turned out to contain different clones (food worker 8 - PT A, B and C) increasing the possibility of food contamination. Acco and others (2003), analyzing samples from nose and hands of food workers found that 11

out of 14 food workers evaluated, harbored multiple strains of *S. aureus* within their nares. Such results demonstrate that multiple isolates of *S. aureus* need to be strain-typed per food worker when attempts are made to identify sources of food poisoning in epidemiological studies and investigations of food contamination sources.

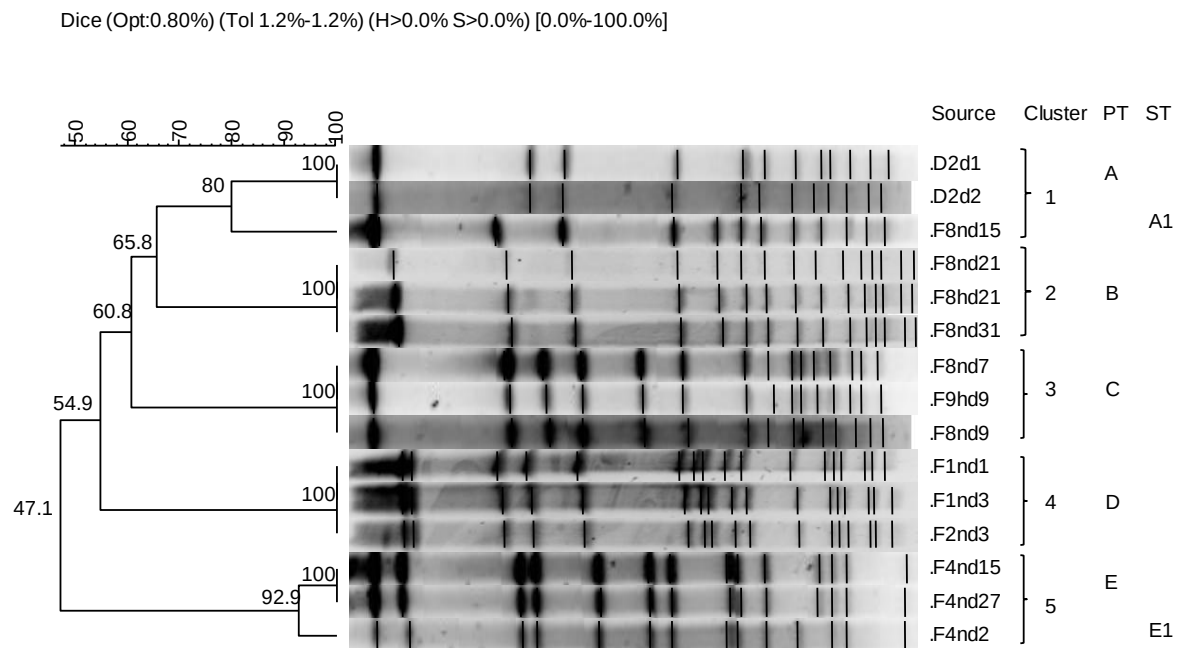


Fig. 1. Clonal relationships of *S. aureus* isolated from a public hospital in Central region, Brazil, established with *Sma*I PFGE analysis. Clusters (CL) were labelled with arabic numbers, pulsotypes (PT) and subtypes (ST) with capital letters and letters and numbers, respectively.

F= food worker; D= diet sample; n= nose sample; h= hand sample; d= day.

Five different electrophoretic profiles (PT A, B, C e D and ST A1) were obtained from 20 *E. coli* strains isolated in both hospitals (Fig. 2). The isolates from the same individual were identical in both hospitals.

In the H1 we observed a PT (A) and a ST (A1) among the handlers and a PT (C) obtained from a diet sample, indicating that the contamination of the diet could be a result of several other factors such as utensils, storage or temperature, instead the handlers. In this hospital, food worker n° 5 persistently harbored the same strain (PT A) in his hands and noses during several months (Fig. 2).

The genetic typing of the 12 isolates of diets and food workers of H2 generated two different profiles. Different workers turned out to contain different clones (PT B and D). The PT D grouped nine isolates from a single handler (n°3) with identical band profiles, therefore, belonging to the same clone. This clone colonized the handler during all the time of the study (Fig. 2).

After comparing the electrophoretic profiles obtained and following the criteria established by Tenover and others (1995) the D7(1) and D7(2) (diets samples) and F1nd7 (food worker n° 1 nares) strains were considered identical. Therefore, it was possible to establish the contamination relationship of the diet by the handler (PT B) (Fig. 2). This fact demonstrates that the handlers represent a risk of bacterial transmission for the final product, especially when one considers that the strains were obtained at the same day.

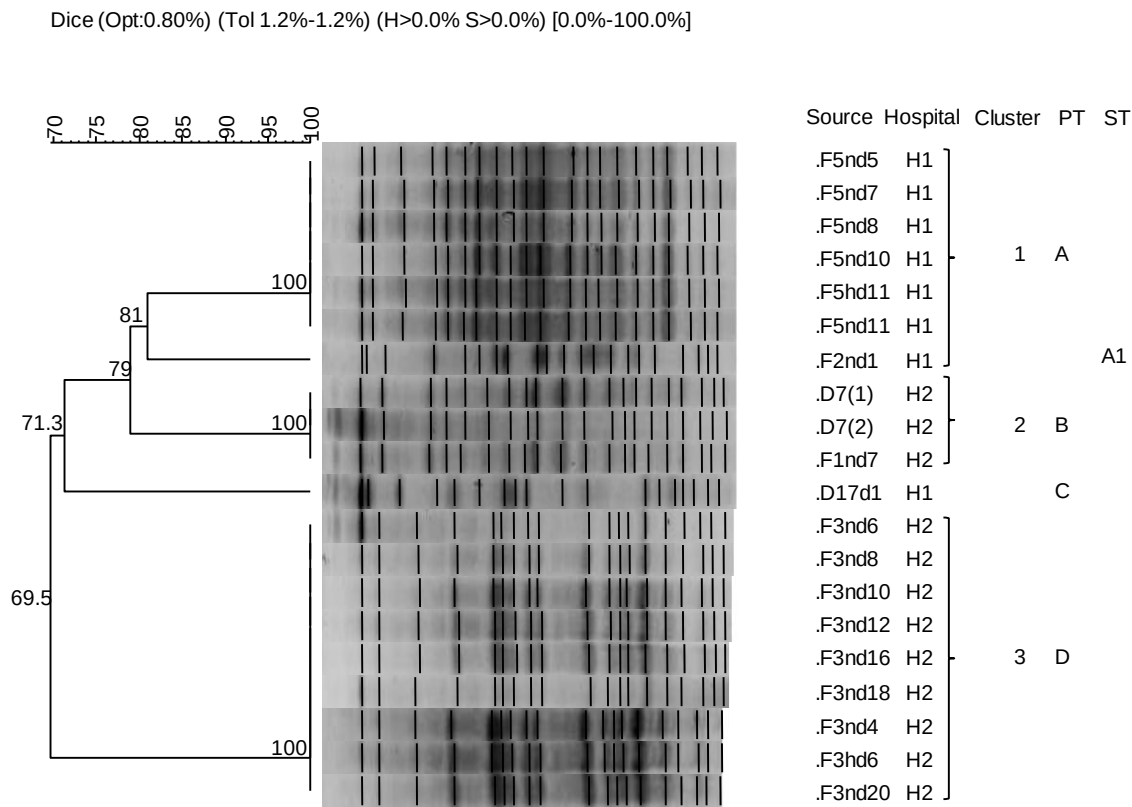


Fig. 2. Clonal relationship of *E. coli* isolated from public hospitals in Central region, Brazil, established with *Xba*I PFGE analysis. Clusters (CL) were labelled with arabic numbers, pulsotypes (PT) and subtype (ST) with capital letters and letter and number, respectively.

F= food worker; D= diet sample; n= nose sample; h= hand sample; d= day,

E. coli was isolated in 20.0% of food workers in H1, and 50.0% in H2. The presence of *E. coli* occurred in seven (5.0%) and ten (8.7%) samples from food workers investigated in H1 and H2, respectively. It was noticed in both hospitals a lower occurrence of isolates in hands (two strains) than in nose (15 strains), which was unexpected, since that this anatomical site is not described as a normal habitat for this microorganism. These results were lower than those found by Curtis and others (2000), where the incidence of *E. coli* in the food workers' hands working at restaurants in Caracas, Venezuela was 21.9%. Monteiro and others (2001), showed 55.0% incidence of *E. coli* in the food workers' hands in an industrial kitchen in Ceara, Brazil.

Contamination of food by food workers due to inadequate hygiene habits or improper practices indicates serious risks of fecal contamination in food, and makes clear the need of constant training of food worker during all food chain. Only through effective and ongoing training programs, plus the awareness of the handlers, a secure food system/environment can be achieved.

CONCLUSIONS

It was evidenced in both hospitals by genetic typing of *S. aureus* and *E. coli* isolates, a clonal diversity of these bacteria among personnel and diets. Nevertheless, it was possible to establish a contamination relationship among *E. coli* isolated from diet and from handlers in H2 and among *S. aureus* isolates in H1. Although, in most of the cases, the enteral foods and food workers harbored genetically unrelated organisms suggesting that diets contamination could be explained by the environment conditions where the diets were prepared, such hygienic conditions of utensils and equipments or air which they have contact during the preparation. The expectation of this study is to encourage public and private hospitals to take measures in order to prevent enteral

nutrition contamination. Therefore, this objective requires the continued implementation of basic education measures, improvement of manufacturing practices and more effective control over food workers, in an attempt for preventing outbreaks of food diseases. The use of a high discriminatory power technique, such as PFGE, made possible the determination of the genetic heterogeneity of isolates of *S. aureus* and *E. coli* obtained, reflecting the complexity of these microorganisms.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq.

REFERENCES

- Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC. 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiol* **20**: 489-493.
- Angelillo IF, Viggiani NMA, Rizzo L, Bianco A. 2000. Food handlers and foodborne diseases: knowledge attitudes and reported behavior in Italy. *J Food Prot* **3**: 381–385.
- APHA. American Public Health Association. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA. 676p.
- Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC. 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol* **92**: 1172–1177.
- Arbeit RD. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC and Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington: American Society for Microbiology. p.116-137.
- Arias ML, Monge R, Artavia J, González P. 2000. Antimicrobial susceptibility pattern of Gram negative bacteria isolated from enteral feeding. *Rev Biomed* **11**: 169-174.

- Arias ML, Monge R, Chavez C. 2003. Microbiological contamination of enteral feeding solutions used in Costa Rican Hospitals. *Arch Latinoam Nutr* **53**: 277-281.
- Barrett JS, Shepherd SJ, Gibson PR. 2009. Strategies to manage gastrointestinal symptoms complicating enteral feeding. *JPEN* **23**: 21-26.
- Brasil. Ministério da Saúde. 2000. Resolução RDC 63, julho de 2000. Regulamento técnico para terapia de nutrição enteral. Diário Oficial da União, 07 de julho de 2000. Available from: <http://www.saude.gov.br>. Accessed: 14 September 2008
- Brasil Ministério da Saúde. 2001. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC 12, janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. Diário Oficial da União, 10 de janeiro de 2001. Available from: <http://www.saude.gov.br>. Accessed: 12 July 2008.
- Chung MLH, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sá-Leão R, Santos Sanches I, Song JH, Tassios PT, Villari P. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* **6**: 189-198.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 16th informational supplement M100-S17. Wayne: PA.
- Curtis ML, Franceschi O, Castro N. 2000. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos em comedores de empresas privadas. *Arq Latinoam Nutr* **50**: 17-182.

Gabor S, Renner H, Matzi V, Ratzenhofer B, Lindenmann J, Sankin O, Pinter H, Maier A, Smolle J, Smolle-Jüttner FM. 2005. Early enteral feeding compared with parenteral nutrition after oesophageal or oesophagogastric resection and reconstruction. *Rev Nutr* **93**: 509-513.

Jensen LB, Hasman H, Agerso Y, Emborg HD, Aarestrup FM. 2006. First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL, carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *J Antimicrob Chemother* **57**: 793-794

Jørgensen HJ, Mørk T, Caugant DA, Kearns A, Rørvik LM. 2005. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl Env Microbiol* **71**: 8352-8361.

Kennedy M, O'Rourke AL, McLay J, Simmonds R. 2000. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O:157 H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *Int J of Food Microbiol* **57**: 147-158.

Klein G & Bulte M. 2003 Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiol* **20**: 27-33.

Kondrup J, Allison SP, Elia M, Vellas B, Plauth M. 2002. ESPEN guidelines for nutrition screening. *Clin Nutr* **22**: 415–21.

Kreymann K, Berger M, Deutz N, Hiesmayr M, Jolliet P, Kazandjiev G, Nitenberg G, van den Berghe G, Wernerman J; DGEM (German Society for Nutritional Medicine), Ebner C, Hartl W, Heymann C, Spies C. 2005. Guidelines on enteral nutrition: intensive care. *Clin Nutr* **25**: 210-223.

- Lange C, Cardoso M, Senczek D, Stefan S. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* **67**: 127-141.
- Martins JFL, Martins ADO, Milagres RCRM, Andrade NJ. 2007. Resistência a antibióticos de *Staphylococcus aureus* isolados de dietas enterais em um hospital público de Minas Gerais. *Semina* **28**: 9-14.
- Monteiro MCN, Timbô MOPP, Oliveira SCA, Abreu SC, Teixeira LA. 2001. Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais do estado do Ceará. *Hig Alimentar* **15**, 90-93.
- Pancorbo-Hidalgo PL, Garcia-Fernandez FP, Ramirez-Perez C. 2001. Complications associated with enteral nutrition by nasogastric tube in an internal medicine unit. *J Clin Nurs* **10**: 482-490.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O:157 H:7, *Salmonella*, and *Shigella* for Pulsenet. *Foodborne Pathog Dis* **3**: 59-67.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BA, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-39.
- Tondo EC, Guimarães MCM, Henriques JAP, Ayub MA. 2000. Assessing and analysing contamination of dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol* **46**: 136–142.
- Toshkova K, Savov E, Soedarmanto I. 1997. Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal carrier. *Zentralbl Bakteri* **286**: 547-59.

Waitzberg DL. 2001. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3^a ed. São Paulo: Atheneu.1858p.

Zadoks R, van Leeuwen WB, Barkema H, Sampimon O, Verbrugh H, Schukken YH, van Belkum A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* **38**: 1931-1939.

Zadoks RN, van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, van Belkum A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking, equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol* **40**: 3894-3902.

RECOMENDAÇÕES

- Tendo em vista as observações realizadas sugere-se a realização de ações educativas voltadas para a orientação e conscientização dos manipuladores em relação à qualidade higiênico-sanitária das dietas enterais. Tais ações compreendem a capacitação dos manipuladores com implantação das Boas Práticas de Fabricação envolvendo toda a cadeia de produção das dietas: controle higiênico-sanitário adequado dos ingredientes, processo de manipulação, armazenamento, transporte e administração das dietas aos pacientes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, além das análises microbiológicas das amostras de dieta enteral, água, módulo em pó e manipuladores, foi realizada também, através de observações captadas durante o período de coleta, uma avaliação de alguns aspectos relacionados aos manipuladores, utensílios e estrutura ambiental, que contribuem para aumentar os possíveis riscos de contaminação das dietas.

Manipulador de alimentos

A avaliação da higiene pessoal dos manipuladores de dietas enterais é importante porque todas as pessoas que manipulam alimentos devem ter muita atenção às boas práticas de higiene pessoal e comportamento no trabalho, com o intuito de proteger os alimentos de contaminações biológicas, químicas e físicas.

Foi verificado, que, no HC, todos os manipuladores dispunham de equipamentos de proteção individual (EPI) como: capote esterilizado, touca de cabelo, pro pé e máscara. No HUGO, apesar da obrigatoriedade da utilização de tais EPIs, nem sempre eles estavam à disposição dos manipuladores devido à sua falta. Sendo assim, muitas vezes, eles se viam obrigados a trabalhar sem as devidas normas de segurança o que tornava o ambiente favorável à contaminação.

Foi também observado, em ambos os hospitais, que apesar dos manipuladores sempre fazerem a higienização das mãos antes de manipularem as dietas, alguns apresentavam unhas crescidas, o que aumentava o risco de uma possível contaminação. No HUGO, outro problema constatado quanto à higienização das mãos foi que os produtos utilizados para tal finalidade eram armazenados em frascos plásticos considerados inadequados, além de serem diluídos em água o que acabava diminuindo o efeito bacteriostático do produto, prejudicando a correta e adequada limpeza das mãos e aumentando, conseqüentemente, o risco de contaminação (Anexo 7, fotos 1, 2 e 3). No HC, no início das coletas, o sabonete utilizado era em barra que ficava exposto ao ambiente, sujeito à contaminação e, portanto, infecção das mãos dos manipuladores. Porém, esse sabonete logo foi

substituído por um sabonete líquido após alerta feito pelo pesquisador responsável deste projeto, a aluna Liana Jayme Borges.

Como se percebe, as práticas de higienização apresentaram inadequações que comprometiam o funcionamento e as condições higiênicas do local, sendo detectadas falhas em relação aos recipientes e utensílios e aos manipuladores. Estas condições reforçam o risco sanitário existente nestas unidades de dietas especiais.

Foi detectada uma ligação entre as práticas inadequadas de manipulação de alimentos e a falta de informação técnica. Cursos de qualificação a respeito de higiene alimentar são, portanto, essenciais para a segurança alimentar.

Avaliação dos utensílios

Os utensílios utilizados pelos manipuladores como liquidificador, medidores plásticos, esponjas de fibra natural ou sintética e panos são de importância fundamental porque podem apresentar fontes de contaminação dos alimentos produzidos.

Com relação aos utensílios de manipulação de alimentos foi observado que muitos manipuladores não faziam a correta higienização do liquidificador, os medidores plásticos não eram higienizados após o seu uso e os panos e esponjas utilizados para limpeza das bancadas ficavam expostos ao ambiente molhados o que facilitava a multiplicação de microrganismos (Anexo 7, foto 4).

Outro problema encontrado está relacionado ao armazenamento destes utensílios, que ficam sobre a bancada sem nenhuma proteção contra insetos (Anexo 7, foto 5).

No HC, foi constatado no início do estudo, que a água utilizada no preparo das dietas era obtida da torneira, fervida e armazenada em recipientes de inox ou plástico tampada sob temperatura ambiente o que poderia vir a ser uma fonte de contaminação das dietas. Foi orientado então de que era necessária a aquisição de um filtro de água (Anexo 7, foto 6).

Estrutura ambiental

A UDE do HUGO fica localizada ao lado de um banheiro o que pode aumentar o risco de uma possível contaminação. Além disso, a UDE apresenta

um *lay out* inadequado não havendo possibilidade de uma melhora em sua estrutura. O local de preparo das dietas é o mesmo onde são feitas as higienizações de utensílios e não há climatizador de ambiente. A única janela existente no local, apesar de conter tela de proteção contra insetos, fica situada sobre a bancada onde as dietas são manipuladas o que pode aumentar o risco de algum tipo de material como fezes de pombo, poeira caírem sobre as dietas e, portanto, sua contaminação (Anexo 7, fotos 7 e 8).

O recipiente para descarte de material existente no local possuía acionamento de pedal, porém encontrava-se danificado, o que obrigava os manipuladores entrarem em contato com a tampa para o descarte de material (Anexo 7, foto 9).

No HC, a UDE fica situada em local apropriado, há um lugar separado para os manipuladores se equiparem com os EPIs, a área de higienização dos utensílios fica separada do local onde as dietas são manipuladas e o ambiente possui climatizador. Foi verificada a presença de lixeira não manual em condições satisfatórias para o rejeito de material.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
R: Delenda Rezende de Melo s/ nº Setor Universitário – CEP 74605-050 / Goiânia –GO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - HUGO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Urgências de Goiânia (CEP/HUGO) através do telefone 3204.4438 ou o pesquisador responsável por este projeto no telefone 3521.1838.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: **Caracterização Fenotípica e Genotípica de Microrganismos Isolados de Manipuladores e Dietas Enteraias Produzidas pela Unidade de Alimentação e Nutrição do Hospital de Urgências de Goiânia.**

Pesquisador Responsável: Profa. Ms. Liana Jayme Borges

Telefone para contato: 3521.1838 (IPTSP/UFMG)/ 3204.4438 (CEP/HUGO)

Pesquisadores participantes: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini, Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, Profa. Ms. Liana Jayme Borges.

Telefones para contato: 3521.1838/3281.7172/9985.8558

- Entende-se por nutrição enteral a alimentação para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada. O suporte nutricional enteral é utilizado como uma terapia de rotina em pacientes com deficiência protéico-calórica, grandes queimaduras, enquanto uma porção do trato digestivo ainda mantém sua capacidade absorptiva. A contaminação microbiana das fórmulas enteraias pode ocorrer em diversas etapas, sendo a manipulação uma etapa especialmente crítica para a contaminação. Tendo em vista a importância da dieta enteral como coadjuvante, ou, em muitos casos como medida terapêutica básica em hospitais e a necessidade de se ofertar produtos com qualidade assegurada, devido aos prejuízos que a mesma pode causar aos pacientes, caso esteja contaminada, esse trabalho tem a proposta de avaliar a qualidade microbiológica de dietas enteraias em sistema aberto manipuladas no Hospital de Urgências de Goiânia, bem como isolar, identificar e caracterizar fenotípica e genotipicamente utilizando o antibiograma e eletroforese em gel em campo pulsado respectivamente, isolados de microrganismos obtidos a partir de manipuladores e dieta enteral, visando estabelecer a possível fonte da bactéria para o produto final.

- Não há riscos, prejuízos, lesão ou desconforto que possa ser provocado pela pesquisa, não havendo a necessidade de indenização ou ressarcimento de despesas, tendo em vista que nenhum tipo de medicamento será utilizado e não haverá realização de procedimento clínico.

- Não há benefícios pessoais decorrentes da participação da pesquisa. A participação apenas contribuirá enormemente para a detecção de microrganismos provenientes da fossa nasal e mãos dos manipuladores.

- A participação incluirá apenas a coleta de 10 amostras da fossa nasal e mãos de cada manipulador e permissão do preenchimento do protocolo de pesquisa. Se o responsável concordar em participar do estudo, as informações a ele relacionadas serão confidencialmente mantidas em sigilo, nem o nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro desta pesquisa, e fica garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo sem penalizações.

- As amostras da fossa nasal e mãos serão coletadas com o uso de swabs, um material absorvente, preso a uma haste, que serve para coletar materiais para exame, pesquisa, limpeza de ferimento. Durante a coleta de amostras da fossa nasal e mãos, o manipulador pode sentir um possível desconforto e/ou constrangimento

Liana Jayme Borges
Pesquisador Responsável



CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____
CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo
“Caracterização Fenotípica e Genotípica de Microrganismos Isolados de Manipuladores e Dietas Enterias Produzidas pela Unidade de Alimentação e Nutrição do Hospital de Urgências de Goiânia” como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Liana Jayme Borges sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade.

Hospital de Urgências de Goiânia - HUGO, _____ de _____ de 2008.

Nome: _____

Assinatura (sujeito): _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
R: Delenda Rezende de Melo s/ nº Setor Universitário – CEP 74605-050 / Goiânia –GO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – HC/UFG

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás ou o pesquisador responsável por este projeto.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: **Tipificação fenotípica e genotípica de microrganismos isolados presentes em manipuladores e dietas enterais de dois hospitais públicos de Goiânia**

Pesquisador Responsável: Profa. Ms. Liana Jayme Borges

Telefone para contato: 3521.1838

Pesquisadores participantes: Prof. Dr. Álvaro Bisol Serafini, Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, Profa. Dra. Maria Raquel Hidalgo Campos e Profa. Ms. Liana Jayme Borges.

Telefones para contato: 3521.1838

- Entende-se por nutrição enteral a alimentação para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada. O suporte nutricional enteral é utilizado como uma terapia de rotina em pacientes com deficiência protéico-calórica, grandes queimaduras, enquanto uma porção do trato digestivo ainda mantém sua capacidade absorviva. A contaminação microbiana das fórmulas enterais pode ocorrer em diversas etapas, sendo a manipulação uma etapa especialmente crítica para a contaminação. Tendo em vista a importância da dieta enteral como coadjuvante, ou, em muitos casos como medida terapêutica básica em hospitais e a necessidade de se ofertar produtos com qualidade assegurada, devido aos prejuízos que a mesma pode causar aos pacientes, caso esteja contaminada, esse trabalho tem a proposta de avaliar a qualidade microbiológica de dietas enterais em sistema aberto manipuladas no Hospital das Clínicas/UFG, bem como isolar, identificar e caracterizar fenotípica e genotipicamente utilizando o antibiograma e eletroforese em gel em campo pulsado respectivamente, isolados de microrganismos obtidos a partir de manipuladores e dieta enteral, visando estabelecer a possível fonte da bactéria para o produto final.

- Não há riscos, prejuízos, lesão ou desconforto que possa ser provocado pela pesquisa, não havendo a necessidade de indenização ou ressarcimento de despesas,

tendo em vista que nenhum tipo de medicamento será utilizado e não haverá realização de procedimento clínico.

- Não há benefícios pessoais decorrentes da participação da pesquisa. A participação apenas contribuirá enormemente para a detecção de microrganismos provenientes da fossa nasal e mãos dos manipuladores.

- A participação incluirá apenas a coleta de amostras da fossa nasal e mãos de cada manipulador e permissão do preenchimento do protocolo de pesquisa. Se o responsável concordar em participar do estudo, as informações a ele relacionadas serão confidencialmente mantidas em sigilo, nem o nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro desta pesquisa, e fica garantido o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo sem penalizações.

- As amostras da fossa nasal e mãos serão coletadas com o uso de swabs, um material absorvente, preso a uma haste, que serve para coletar materiais para exame, pesquisa, limpeza de ferimento. O manipulador não terá nenhum desconforto durante as coletas, porém pode ocorrer um possível constrangimento..



Liana Jayme Borges

Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____

CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo

“Tipificação fenotípica e genotípica de microrganismos isolados presentes em manipuladores e dietas enterais de dois hospitais públicos de Goiânia”

como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Liana Jayme Borges sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade.

Hospital das Clínicas - HC, _____ de _____ de 200__

Nome: _____

Assinatura (sujeito): _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO 3

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 054/07

Goiânia, 15/05/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): *Orientador: Dr. Alvaro Bisol Serafini*
PESQUISADORES: *Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André, Liana Jayme Borges, Maria Raquel Hidalgo Campos, Fabiana Cristina Pimenta*

TÍTULO: *"Caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos isolados de manipuladores e dietas enterais produzidas pela unidade de dietas especiais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás"*

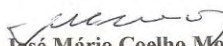
Área Temática: *Grupo III*

Local de Realização: *IPTSP/UFG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **aprovou sem restrições**, o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

ANEXO 4

SECRETARIA DA SAÚDE
DO ESTADO DE GOIÁSGOVERNO DO
ESTADO DE GOIÁS
Desenvolvimento com Responsabilidade

Hospital de Urgências de Goiânia

PARECER FINAL/ CEP/HUGO/SES N° 67/08

Protocolo CEP/HUGO/SES N°075/08

Folha de Rosto: 230395

Título: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE MANIPULADORES E DIETAS ENTERAIS PRODUZIDAS PELA UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO DO HOSPITAL DE URGÊNCIAS DE GOIÂNIA (HUGO).

Pesquisadores responsáveis:

- ÁLVARO BISOL SERAFINI.
- LIANA JAIME BORGES

Área Temática: Grupo III

Local de realização: HUGO.

PROJETO APROVADO

Recomendações: O Pesquisador deve apresentar relatórios quinzenais para projetos com duração de 30 dias, mensais para projetos de 31 a 90 dias e trimestral para projetos com duração superior a 90 dias.
Comunicar primeiramente ao CEP qualquer intercorrência ou mudança durante o projeto.
O relatório final deve ser entregue juntamente com o trabalho para arquivo no Cep.

Goiânia, 12 de dezembro de 2008.


Elisângela Cristiane Fontoura da Silva
Coordenadora do CEP/HUGO/SES


Daniella Fabíola dos Santos
Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa

ANEXO 5



05-Feb-2010

Dear Prof. André:

Your manuscript entitled "MICROBIOLOGICAL QUALITY AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM ENTERAL NUTRITION ENVIRONMENT IN PUBLIC HOSPITALS" by Borges, Liana; Campos, Maria Raquel; André, Maria Cláudia; Serafini, Álvaro, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Food Safety.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Food Safety.

Sincerely,

Journal of Food Safety Editorial Office

Link do artigo: link: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2010.00275.x/pdf>

Journal of Food Safety

Volume 31, Issue 1, pages 125–131, February 2011

JOURNAL OF FOOD SAFETY

INFORMATION FOR AUTHORS

The *Journal of Food Safety* encourages submissions of full-length original research articles emphasizing mechanistic studies involving inhibition, injury, and metabolism of food poisoning microorganisms, as well as the regulation of growth and toxin production in both model systems and complex food substrates from microbiologists, food processors, and food researchers with essential information on microbial food safety.

Editorial Office: Karl Matthews, Department of Food Science, Rutgers University, 65 Dudley Road, New Brunswick, NJ 08903. Phone: (732) 932-9611; email: matthews@AESOP.Rutgers.edu

MANUSCRIPT SUBMISSION

The *Journal of Food Safety* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then visit: <http://mc.manuscriptcentral.com/foodsafety>. IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created.

All papers must be submitted via the online system.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .rtf, .ppt, .xls. LaTeX files may be submitted provided that an .eps or .pdf file is provided in addition to the source files. Figures may be provided in .tiff or .eps format.

Please note: This journal does not accept Microsoft Word 2007 documents at this time. Please use Word's "Save As" option to save your document as a .doc file type. If you try to upload a Word 2007 document in Manuscript Central you will be prompted to save .docx files as .doc files.

NEW MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Upload your manuscript files. At this stage, further source files do not need to be uploaded.

LaTeX users. For reviewing purposes you should upload a single .pdf that you have generated from your source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box.

REVISED MANUSCRIPT

Non-LaTeX users. Editable source files must be uploaded at this stage. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

LaTeX users. When submitting your revision you must still upload a single .pdf that you have generated from your revised source files. You must use the File Designation "Main Document" from the dropdown box. In addition you must upload your TeX source files. For all your source files you must use the File Designation "Supplemental Material not for review". Previous versions of uploaded documents must be deleted. If your manuscript is accepted for publication we will use the files you upload to typeset your article within a totally digital workflow.

COPYRIGHT AND PERMISSIONS

Publication in the journal is subject to the condition that the article (as a whole or in part) has not been published or submitted for publication elsewhere. In submitting the manuscript to the publisher, the author certifies that neither the author's contribution nor any text or figures procured and included by the author infringes upon the rights of a third party, and that the author alone is authorized to dispose of the existing right of utilization. The author will refrain from any other duplication and distribution or digital transfer and reproduction (e.g., on the Internet) during the period of the contract. In order for an article to be distributed as widely as possible in the journal, the author must assign to Wiley-Blackwell the copyright in and to the article, and all rights therein, including but not limited to the right to publish, republish, transmit, sell, distribute and otherwise use the article in whole or in part in electronic and print editions of the Journal and in derivative works throughout the world, in all languages and in all media of expression now known or later developed, and to license or permit others to do so. Reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the final article in whole or in part in any medium by the author as permitted by this Agreement requires a citation to the Journal and an appropriate credit to Wiley-Blackwell as Publisher suitable in form and content as follows:

(Title of Article, Author, Journal Title and Volume/Issue, Copyright © [year], copyright owner as specified in the Journal). Links to the final article on Wiley-Blackwell's website are encouraged where appropriate.

Copyright Transfer Agreement (CTA). Authors will be required to sign a **Copyright Transfer Agreement** transferring copyright in the article from the author to the publisher. The CTA will allow the publisher to publish the article in print and online, to administer rights, and to follow up on any infringements of copyright. Manuscripts will not be sent to the publisher for production until a CTA form has been signed and submitted. Please submit a completed, signed Copyright Transfer Agreement form when submitting an article for publication. The CTA can be found by clicking on the link <http://www.wiley.com/go/ctaus>. Authors **must** sign, scan and upload the Copyright Transfer Agreement to the online system:

Permission grants. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from online or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley **Permission Request Form**.

The Copyright Transfer Agreement Form and the Permissions Request Form should be uploaded as "Supplementary files not for review" with the online submission of your article.

If you do not have access to a scanner, further instructions will be given to you after acceptance of the manuscript.

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed

Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/CTA.asp>.

MANUSCRIPT STYLE

The language of the journal is English. 12-point type in one of the standard fonts: Times, Helvetica, or Courier is preferred. It is not necessary to double-line space your manuscript. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate figure files.

- During the submission process you must enter the full title, short title of up to 70 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs. Also, include the names and email addresses of two potential reviewers of the manuscript.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Enter an **abstract** of not more than 150 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Include a description of not more than 150 words of the practical uses--actual or potential--of the research presented in your manuscript. This text should be entitled "**Practical Applications**" and appear just below the abstract.

The **main text** should follow the arrangement described below:

- **Introduction:** Be brief and state the reason for the work in relation to the field, indicating what new contribution is made by the work described.
- **Materials and Methods:** Provide enough information to allow other investigators to repeat the work. Avoid repeating the details of procedures that have already been published elsewhere.
- **Results:** Present results as concisely as possible. Do not use tables and figures to present of the same data.
- **Discussion:** Interpret the results here. The results should not be repeated, though in some cases it might be desirable to combine results and discussion sections.
- **References:** Responsibility for the accuracy of citations rests entirely with the author(s). In the text, give references by the surname of the authors and the year, using *et al.* when there are more than two authors. In the References section, list all authors, organizing the references alphabetically by the primary author's surname.

Reference style. References to papers in press should indicate the name of the journal, following the abbreviation used in *Chemical Abstracts*, and should only be used for papers that have been accepted for publication. Refer to submitted papers by such terms as "unpublished observations" or "private communication," though use such resources only when absolutely necessary.

Follow standard nomenclature as used in the scientific literature and avoid laboratory jargon. If abbreviations or trade names are used, define the material or compound the first time that it is mentioned.

Where possible the DOI* for the reference should be included at the end of the reference. Online citations should include date of access.

References should be listed in the following style:

DEWALD, B., DULANEY, J.T. and TOUSTER, O. 1974. Solubilization and polyacrylamide gel electro-phoresis of membrane enzymes with detergents. In *Methods in Enzymology*, Vol. xxxii, (S. Fleischer and L. Packer, eds.) pp. 82-91, Academic Press, New York.

HASSON, E.P. and LATIES, G.G. 1976. Separation and characterization of potato lipid acylhydrolases. *Plant Physiol.* 57, 142-147.

ZABORSKY, O. 1973. *Immobilized Enzymes*, pp. 28-46, CRC Press, Cleveland, Ohio.

*The Digital Object Identifier (DOI) is an identification system for intellectual property in the digital environment. Developed by the International DOI Foundation on behalf of the publishing industry, its goals are to provide a framework for managing intellectual content, link customers with publishers, facilitate electronic commerce, and enable automated copyright management.

Illustrations. Should be intelligible without reference to the text, though each one should be referenced in the text. Number illustrations consecutively with Arabic numerals. The title of the illustration should appear as in the following example:

TABLE 1. ACTIVITY OF POTATO ACYL-HYDROLASES ON NEUTRAL LIPIDS, GALACTOLIPIDS, AND PHOSPHOLIPIDS

Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

Acknowledgments. Where applicable, list acknowledgments on a separate page.

Short notes. Short notes will be published where the information is deemed sufficiently important to warrant rapid publication. The format for short papers

may be similar to that for regular papers but more concisely written. Short notes may be of a less general nature and written principally for specialists in the particular area with which the manuscript is dealing. Manuscripts that do not meet the requirements of importance and necessity for rapid publication will, after notification of the author(s), be treated as regular papers. Regular papers may be very short in length.

Please be advised that clarity of language is a requirement of acceptance.

Those authors for whom English is not their primary language should seek the assistance of a professional editing service before submitting their manuscript for consideration. Follow the link below for more information on professional editing services:

http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp

POST ACCEPTANCE

Further information. For accepted manuscripts the publisher will supply proofs to the corresponding author prior to publication. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimize the risk of the paper being held over to a later issue. Once your article is published online no further amendments can be made. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>).

Author Services. Manuscript now accepted for publication? If so, please register for Wiley-Blackwell's Author Services to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the services offers, including Article Tracking, E-mail Publication Alerts, and Citation Tools. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.

Early View. The *Journal of Food Safety* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Online Open. The *Journal of Food Safety* accepts articles for Open Access publication.

ANEXO 6



04-Feb-2010

Dear Prof. Liana Borges:

This is to inform you that the following manuscript, for which you are a contributing author, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Food Science

Manuscript Title: Molecular Epidemiology of Microorganisms Isolated From Food Handlers and Enteral Feeding of Public Hospitals

Manuscript Number: JFS-2010-0127

Amanda Ferguson
Manager, IFT Scientific Journals
525 W. Van Buren, Suite 1000
Chicago, Illinois 60607
(312) 604-0276
jfs@ift.org

Journal of Food Science

Vol 75, Nr. 7, 2010

Author Style Guide for IFT Scientific Journals

MISSION STATEMENT

The Institute of Food Technologists (IFT) publishes scientific journals to provide its members with high-quality scientific information in the area of food science and technology. The *Journal of Food Science* (JFS), available with subscription in print and/or online, provides results of original research and short interpretive reviews on the physical, chemical, and biological aspects of food science and technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (CRFSFS), available online only and currently open access, provides in-depth interpretive reviews in these same areas, and in risk analysis. The *Journal of Food Science Education* (JFSE), available online only and open access, provides information of all kinds relevant to those involved in food science education at all levels. IFT is dedicated to maintaining the highest standards of professional ethics, accuracy, and quality in all matters related to handling manuscripts and reporting scientific information.

General Editorial Policies

Authorship Criteria and Author Responsibilities

This material is provided for those authors who may be unaware of generally accepted professional standards.

To serve IFT journals readership, as you prepare your paper, please carefully consider papers published recently in the *Journal of Food Science* for relevance to your study.

Authorship is restricted to those who:

1. Have contributed substantially to one or more of the following aspects of the work: conception, planning, execution, writing, interpretation, and statistical analysis.
2. Are willing to assume public responsibility for the validity of the work.

Membership in the Institute of Food Technologists is not a prerequisite for consideration of manuscripts for publication. However, page charges for members have been eliminated

(see "[Page Charges](#)" below).

Exclusivity of Work

The corresponding author must verify, on behalf of all authors (if more than one), that neither this manuscript nor one with substantially similar content has been published, accepted for publication, or is being considered for publication elsewhere, except as described in an attachment. It is the authors' responsibility to ensure the integrity of all submitted works. For further guidance, see the

Disclosure requirements

Troublesome situations have arisen where a reader accuses an author of bias because of undisclosed financial interests in the results of a publication. To help avoid such embarrassing instances, each author, when submitting a manuscript, must disclose any meaningful affiliation or involvement, either direct or indirect, with any organization or entity with a direct financial interest in the subject matter or materials discussed (for example, employment, consultancies, stock ownership, grants, patents received or pending, royalties, honoraria, expert testimony). These kinds of financial involvement are fairly common, unavoidable, and generally do not constitute a basis for rejecting a manuscript. Specifics of the disclosure will remain confidential. If deemed appropriate by the Scientific Editor, a general statement regarding disclosure will be included in the Acknowledgment section of the manuscript. The Acknowledgment section must also reveal all sources of support for the work, both financial and material.

Copyright

The corresponding author will be asked to sign a Copyright Assignment Form on behalf of all authors upon acceptance of the manuscript. Copyright to published manuscripts becomes the sole property of IFT, except in cases where the work cannot be copyrighted (for example, works authored solely by government employees as part of their employment duties).

Reproduction of all or a significant portion of an IFT publication by anyone, including authors, is prohibited, unless prior permission is received from IFT's Rights & Permissions Controller. Authors have the right to reproduce extracts from their own papers with proper acknowledgment and retain the right to any patentable subject material that might be contained in the article. Information on how to request permission to reproduce material is available at: http://members.ift.org/NR/exeres/1DFD43ED-F98D-4E3C-A52D-BB73301B827C.htm?NRMODE=Unpublished&wbc_purpose=Basic&WBCMODE=PresentationUnpublished or by emailing the citation, section(s) to be reproduced, and description of work to be published to: JournalsRights@oxon.blackwellpublishing.com.

Disclaimer

Opinions expressed in articles published in an IFT journal are those of the author(s) and do not necessarily represent opinions of the IFT. IFT does not guarantee the appropriateness, for any purpose, of any method, product, process, or device described or identified in an article. Trade names, when used, are only for identification and do not constitute endorsement by IFT.

Publication Criteria

Factors considered when judging the suitability of a manuscript for publication are: Interest readers will have in the subject; Relevance to human foods; Originality, scientific quality (including appropriateness of the experimental design and methods, depth of investigation, proper statistical analysis of the data); Importance and substance of the results, and the thoroughness and accuracy with which the results are interpreted.

Page and Color Charges

Manuscripts on original research are subject to the following page charges:

IFT Members: There are no page charges for papers submitted by IFT Members after

January 1, 2007.

Non-Members: \$85 per printed page for the first 4 pages (\$120 per page for each

additional page).

For all authors, color can be included for an additional fee of \$500 per color figure. Alternately, figures may be published in color online but in grayscale in the print version at no charge.

When payment is possible only from an author's personal funds, and this means of payment would impose undue financial hardship, a request for **partial or full waiver** of this charge can be made, provided this is done **prior to publication**. In this instance, a statement certifying that the author's employer(s) is unable to pay because of financial distress, and that the author cannot personally pay because this would impose an undue financial burden, signed by both the author and the employer, should be sent -- prior to publication -- to the Managing Editor by email to jfs@ift.org or by fax to 312.596.5676.

Concise Reviews and Hypothesis Papers are exempt from page charges, provided the Scientific Editor (Daryl B. Lund, dlund@cals.wisc.edu) is consulted and issues an invitation in advance of submission. There are no page charges for manuscripts published in JFSE and CRFSFS.

Reprints

Following acceptance of a paper and prior to publication, the author will be given the opportunity to purchase reprints. An order form and rate schedule will be included with the manuscript's page proof. Reprints can also be ordered anytime after publication.

Permission to publish

If the paper has been presented at a meeting of an organization other than IFT, the author must certify that he/she has freedom to offer it to IFT for publication.

Letters to the Editor

Comments, observations, different perspectives, and suggestions for improvement on concept and techniques previously published, or for the need for research in specific areas, are welcome and accepted by all three journals. Send letters to Daryl B. Lund (JFS), Manfred Kroger (CRFSFS), or Grady Chism (JFSE).

Journals and Journal Sections

Authors are asked to indicate the desired section for their manuscript when submitting the paper. Choose among:

Journal of Food Science

JFS: Concise Reviews and Hypotheses in Food Science

Scientific Editor: Daryl B. Lund. Covers all aspects of food science identified in the descriptions of sections in JFS. Reviews should provide in-depth coverage of a narrowly defined topic, and embody careful evaluation of all pertinent studies (weaknesses, strengths, and explanation of discrepancies in results among similar studies), so that insightful interpretations and conclusions can be presented. Hypothesis manuscripts are appropriate in pioneering areas of research or important areas that are impacted by scientific controversy.

JFS: Food Chemistry

Scientific Editor: David B. Min. Coverage of original research on mechanisms, kinetics, and analytical methods of chemical and biochemical interactions of foods and food components that affect food value, nutritional quality, and physical functionality; structural identifications and/or functions of water; nutraceuticals; bioactive compounds, macronutrients including proteins, carbohydrates, and lipids; micronutrients including minerals and vitamins; phytochemicals, and food additives (such as hydrocolloids, emulsifiers, antioxidants, flavors, colorants, dietary fiber, sweeteners, stabilizers, and enzymes); chemistry of modification of food ingredients or components to improve functionality and nutritional quality.

JFS: Food Engineering and Physical Properties

Scientific Editor: M. Anandha Rao. Coverage of original research on engineering aspects of unit operations associated with food preservation/processing, and food waste recovery, with emphasis on systems design and analysis, modeling, simulation, and optimization, as well as: measurement and interpretation of physical, rheological, and thermodynamic properties, and materials science of food and food packaging, including surface properties and interactions, and glass transitions. Manuscripts on food

properties should contain quantitative supporting data and interpretation of observations in terms of either microstructure or chemical composition.

JFS: Food Microbiology and Safety

Scientific Editor: Catherine Donnelly. Coverage of original research on basic and applied aspects of foodborne pathogens and spoilage organisms; food fermentation and preservation; microbial growth and inactivation; and microbial detection methods: efficacy of new processing technologies for achieving microbial inactivation; molecular basis for microbial inactivation and inhibition through genome sequencing and mapping; molecular technologies to assist in the rapid identification and discrimination of target pathogens; behavior of probiotic bacteria and starter cultures towards bacterial pathogens; microbiological criteria for foods for regulatory and food safety assurance; epidemiological surveillance of bacterial pathogens; novel chemicals, food components or technologies which promote food safety by achieving microbial/viral/parasite inactivation or inhibition; and mathematical modeling to predict the behavior of pathogen/food interactions.

JFS: Sensory and Food Quality

Scientific Editor: Herbert Stone. Coverage of original basic and applied research related to quantitative and subjective assessments of food quality, either sensory (appearance, color, odor, flavor, and/or texture), physical, chemical, nutritional, and/or combinations; quality attributes of food as influenced by ingredient technology, processing, packaging, and storage.

JFS: Nanoscale Food Science, Engineering, and Technology

Scientific Editor: M. Anandha Rao. Coverage of original research on fundamental principles of producing, analyzing, and characterizing nanoscale food particles (materials with at least one dimension at roughly between 1 to 100 nm); nanoscale materials; nanoscale-based devices and systems for detection and intervention technologies for food safety and quality; characterization and standards include transport phenomena, kinetics, catalysis, and rheological investigations on functionality of nanoscale food particles in dispersions, gels, foams, and emulsions; experimental and theoretical studies on product stability and sensory properties; toxicological, physiological, and metabolic studies; societal considerations; application of nonfood nanoscale particles that extend the shelf life of foods (such as packaging).

JFS: Health, Nutrition, and Food

Scientific Editor: Tung-Ching Lee. Coverage of original research that integrates food science and technology with applied personal and public health nutrition. Topics may include: studies on nutritional and health impacts of foods and food components using human subjects or appropriate animal models; adaptation and application of technologies that enhance the content and/or biological availability of healthful components in foods; effects of postharvest handling,

processing, and storage on the stability and biological activity of bioactive food components and nutraceuticals; preparation and analysis of functional foods; and methods development for analysis of bioactive food ingredients and their metabolites.

JFS: Toxicology and Chemical Food Safety

Scientific Editor: David B. Min. Coverage of original research papers on occurrence, safety and toxicological evaluation, detoxification, conditions of formation, analysis, regulatory control, and surveillance of natural and man-made chemical compounds in food including pesticide and veterinary drug residues, environmental contaminants, anti-nutritive compounds, natural toxins, mycotoxins, trace elements, migrants from food packaging, contaminants formed during food processing, and food allergens; toxic effects, in animals or humans, of natural or man-made chemical compounds occurring in food including potential beneficial and possible adverse health effects created by the interaction of components within the food matrix to scripted or OTC medications or dietary supplements.

Performance Attributes

- Data from Journal Citation Reports, 2008: Impact Factor 1.489; 5-year Impact Factor 1.628
- Manuscript acceptance rate (2009): about 40%

Manuscript Requirements

General Instructions

Use the English language (American spelling and usage) and the SI system (Système International d'Unités, often referred to as "International Units") for measurements and units.

Unless otherwise stipulated, the style and format of manuscripts submitted to *JFS* and the two online e-journals should follow ***Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors and Publishers*** 2006, 7th ed. (Council of Scientific Editors, Reston, VA). For convenience, refer to articles in the latest issue of the journal for details or contact the JFS Editorial Office with your questions.

Review the Supplementary Instructions (see below) for preparing manuscripts on special topics (flavor, fruits and vegetables, nutrition, engineering, and so forth).

Footnotes are not published in IFT Scientific Journals. If necessary, place footnote material directly in the text, separated by parentheses.

All manuscripts should be submitted electronically through ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jfs>). See the Manuscript Submission page for details.

Research Paper Template (MS Word)

Use this working template as a visual guideline. Simply remove the guides and fill in the appropriate information.

Page Format

- Continuous line numbering for the *entire* manuscript is mandatory.
- Double space *entire* manuscript.
- Submitted manuscripts *must* list full names for all authors; that is, full first/given name(s), middle initial(s), and last/surname(s).
- Failure to comply with these formatting instructions can result in *automatic rejection* of the manuscript.

Tables

- Enter a short descriptive caption at the top of each table, preceded by an identifying Arabic numeral.
- Enter one table per page positioned as close as possible to the citation.
- Columns and their headings are normally (but not always) used to display the dependent variable(s) being presented in the table. Footnotes should be identified by lowercase letters appearing as superscripts in the body of the table and preceding the footnote below the table. The same data should not appear in both tables and figures.
- All data reported in numerical form must take into account significant figures.

Figures (graphs, charts, photographs, and other illustrations)

(a) General instructions

- Enter a descriptive caption at the bottom of each figure, preceded by an identifying Arabic numeral.
- Enter one figure per page positioned as close as possible to its citation.
- You are responsible for obtaining permission to reproduce copyrighted figures. Proof of permission to reproduce is required.
- Submit your figures at least twice the size they will appear when published at 300 dots per inch (dpi) or greater.
- Be sure to use lettering, data lines, and symbols sufficiently large and thick to be clearly legible when the figure is reduced to the normal published size.
- All data reported in numerical form must take into account significant figures.

- Avoid redundancy between the figure caption and information in the figure.
- When a color presentation is deemed necessary, please note this at the indicated point during electronic submission of your manuscript. There is a color printing fee of \$500 per figure, invoiced before publication; alternately, figures can be color online but grayscale in print for no charge.

(b) Special instructions for graphs

- Keep as simple as possible.
- Dependent variable should be presented on the vertical axis (y or ordinate).
- Independent variable should be presented on the horizontal axis (x or abscissa).
- The label for each axis should be parallel to, and centered on, the axis; that is, the label for the vertical axis should be rotated 90° counterclockwise from normal.
- Axis labels should be followed by the units of measurement in parentheses, with abbreviations shown elsewhere in these Instructions.
- Range of values presented on each axis should be no larger than the range of values being presented.
- All data reported in numerical form must take into account significant figures.
- If data lines are close together and/or intersect, do not present more than 4 lines per figure.
- If data lines are well separated and few or none intersect, a maximum of about 8 lines per figure may be entered.
- Identify lines directly, if feasible. If not, enter key box at a blank area inside the graph.
- Avoid simultaneous use of a new symbol and a new line style.
- Avoid, if possible, presenting more than 8 data bars per figure.
- Avoid using shades of gray on bars or lines.

Manuscripts on original research

Manuscripts on original research should include the following elements.

Title page as page 1.

Include:

1. Full title (be concise) **Use Title Case**.
2. Name(s) of author(s) and author affiliation(s) with complete address(es);
3. Contact information for the corresponding author, including full name, complete mailing address, telephone, fax, and e-mail address.

4. Short version of title (less than 40 letters and spaces) followed by an ellipsis (. . .).
5. Choice of the journal section in which you would like your article to appear, choosing from those listed above.
6. Previous address(es) of author(s) if research was conducted at a place different from current affiliation.
7. *ScholarOne Manuscripts will indicate where this information should be entered.*

Abstract, starting on page 2

Include:

1. An abstract **not exceeding 250 words**; all acronyms and abbreviations defined; no references cited. State what was done, how it was done, major results, and conclusions.
2. Five key words for indexing purposes. It is highly recommended to choose keywords from our established list in ScholarOne Manuscripts, when possible, to aid in consistency.

Practical Application (Optional)

1. Enter "Practical Application:" followed by a brief description, in layman's terms, of the potential industrial or consumer application of the research presented in your paper. Keep the description short, about 1 to 3 sentences, and in language non-scientist readers can easily understand. The brief should describe probable uses for your work, whether for direct commercial application, to aid in further research efforts, or for consumer impact. Do not make unreasonable claims that cannot be derived from the work described in the paper.
2. *ScholarOne Manuscripts will indicate where this information should be entered*

"Introduction"

In two pages or less, review pertinent work, cite key references, explain importance of the research, and state objectives of your work.

"Materials and Methods"

Provide sufficient detail so work can be repeated. Describe new methods in detail; accepted methods briefly with references. Use subheadings as needed for clarity.

Use of Trade names. Trade names are to be avoided in defining products whenever possible. If naming a product trade name cannot be avoided, the trade names of other like products also should be mentioned, and first use should be accompanied by the superscript symbol [™] or ®, followed in parentheses by the owner's name. If a product trade name is used, it is

imperative that the product be described in sufficient detail so the nature of the product will be understood by professionally trained readers. Do not use trade names in titles.

The mention of critical, especially novel, supplies and pieces of equipment ought to be followed, in parenthesis, by name of manufacturer or provider, and on the first mention only, city, state/province, and country (such as Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Mo., U.S.A.).

Use of abbreviations and acronyms. At first use in the text use abbreviated term, followed by abbreviation or acronym in parentheses. Do not use abbreviations and acronyms in titles.

Statistical analysis. If variation within a treatment (coefficient of variation, the standard deviation divided by the mean) is small (less than 10%) and difference among treatment means is large (greater than 3 standard deviations), it is not necessary to conduct a statistical analysis. If the data do not meet these criteria, appropriate statistical analysis must be conducted and reported.

"Results and Discussion"

Present and discuss results concisely using figures and tables as needed. Do not present the same information in figures and tables. Compare results to those previously reported, and clearly indicate what new information is contributed by the present study.

"Conclusion"

State conclusions (not a summary) briefly in one paragraph and without references.

"References"

List only those references cited in the text. Consider citing papers previously published in IFT scientific journals. Required format of references is described below.

"Acknowledgment"

List sources of financial or material support, the names of individuals whose contributions were significant but not deserving of authorship, and journal series numbers. Acknowledgment of an employer's permission to publish will not be printed.

"Appendix"

This section is rarely needed in a research paper but can be added if deemed necessary (for example, complicated calculations, detailed nomenclature).

FORMATTING REFERENCES

Details for formatting references

Manuscripts intended for all sections of the journal and the two online journals must follow the name-year reference format specified in *Scientific Style and Format*, 7th ed., cited above. Cite only necessary publications and use primary rather than secondary references when possible. It is acceptable to cite work that is “forthcoming” (that is, accepted but not published) with the pertinent year and volume number of the reference. Works that are “submitted” and under review are not to be cited.

To serve JFS readership and subscribers, as you prepare your manuscript, please carefully consider papers published recently in the *Journal of Food Science* for relevance to your study.

(a) In text

(b) When the author’s name is part of the sentence structure, the citation consists of the year (in parenthesis) immediately following the name. Use “and others” rather than “et al.” In citations that are totally parenthetical, do not separate author and year with a comma. Use commas to separate publications in different years by the same author. Cite two or more publications of different authors in chronological sequence, from earliest to latest.

Examples

- Smith (1943) showed that . . . :
- The starch granules are normally elongated in the milk stage (Brown 1956).
- . . . work (Dawson and others 1964) has shown that . . .
- . . . work (Dawson and Briggs 1984, 1987) has shown that . . .
- . . . work (Dawson 1984; Briggs 1999) has shown that . . .
- . . . work (Dawson 1984a,b) has shown that . . .

(b) In Reference section

List only those references cited in the text. References are listed alphabetically by the first author’s last name. Single author precedes same author with co-authors. When the author designation (name or names) is identical in two or more references, these references are sequenced by publication date (earliest to latest). Type references flush left as separate paragraphs. Within a citation, do not indent manually, let the text wrap. Use the following format.

- **Journal article:** Author(s). Year. Article title. Journal title. Volume number: inclusive pages.
- *Example:*

- Smith JB, Jones LB, Rackly KR. 1999. Maillard browning in apples. J Food Sci 64:512-8.
- Form of citation in text: (Smith and others 1999).
- **Note:** There are no periods in abbreviated journal titles, there is no space before or after the colon of the citation, and issue number may or may not be included behind the volume number, but must be provided for articles from periodicals that do not number pages continuously throughout each volume.
- **Electronic journal article:** Author(s). Year. Title of article. Name of electronic journal [serial online]. Volume number: inclusive pages. Available from [give site]. Posted date.
- *Example:*
- Steinkraus KH. 2002. Fermentation in world food processing. Comp Rev Food Sci Food Safety [serial online]. 1:23-32. Available from IFT (ift.org). Posted Apr 1, 2002. Form of citation in text: (Steinkraus 2002)
- **Note:** Because URLs are frequently discontinued, it is strongly recommended to give the URL address as it was when first cited.
- **Book:** Author(s) [or editor(s)]. Year. Title. Edition or volume (if relevant). Place of publication: Publisher name. Number of pages.
- *Example:*
- Spally MR, Morgan SS. 1989. Methods of food analysis. 2nd ed. New York: Elsevier. 682 p. Form of citation in text: (Spally and Morgan 1989).
- **Chapter in book:** Author(s) of the chapter. Year. Title of the chapter. In: author(s) or editor(s). Title of the book. Edition or volume, if relevant. Place of publication: Publisher name. Inclusive pages of chapter.
- *Example:*
- Rich RQ, Ellis MT. 1998. Lipid oxidation in fish muscle. In: Moody JJ, Lasky, UV, editors. Lipid oxidation in food. 6th ed. New York: Pergamon. p 832-55.
- Form of citation in text: (Rich and Ellis 1998).
- **Conference Proceedings:** Editor(s). Title of publication. Number and name of conference; date of conference; place of conference. Place of publication: publisher; date. Extent. Notes.
- *Example:*
- Webb R, Steagall T, Brown A, editors. PAAPT 2008. Proceedings of the 4th National Conference on Processing Technologies; 2008 April 9-12;

Portland, OR. Chicago, IL: American Association of Processing Technology; c2008.

- Form of citation in text: (Webb and others 2008).
- **Patent:** Name of the inventor(s) of the patented device or process; the word “inventor(s),” assignee. Date issued [year month day]. Title. Patent descriptor [name of country issuing the patent and the patent number].
- *Example:*
- Harred JF, Knight AR, McIntyre JS, inventors; Dow Chemical Co., assignee. 1972 Apr 4. Epoxidation process. U.S. patent 3,654,317.
- Form of citation in text: (Harred and others 1972).
- **Dissertation:** Author. Date of degree. Title [type of publication, such as dissertation, DPhil thesis, MSc thesis] Place of institution: Institution granting degree. Total number of pages. Availability statement.
- *Example:*
- Smith DE. 1988. Lipid oxidation at very low water activities. [DPhil dissertation]. Ithaca, NY: Cornell Univ. 210 p. Available from: University Microfilms, Ann Arbor, MI: ABD62-83.
- Form of citation in text: (Smith 1988).
- **Websites and other internet material:** Title or webpage or database [medium designator]. Edition (if relevant). Place of publication: Publisher; date of publication [date updated; date accessed]. Notes.
- *Example:*
- FoodSciNet: Education resources online [Internet]. Columbus, OH: Food Science Education Association; c1999-2008 [Accessed 2008 Oct 17]. Available from: <http://foodscinet.org>.
- Form of citation in text: (FoodSciNet 2008)

For journal abbreviations and other examples of reference formats, please refer to articles in the latest issue of the journal or contact the Managing Editor at jfs@ift.org.

Supplementary Instructions for Specific Topics

Sensory Evaluation

Nutrition

Food Engineering

Food Microbiology

Seafood Technology

Fruit & Vegetable Products

Foodservice

Editorial Review and Processing

Submitting your Manuscript Electronically

- IFT's scientific journals do not accept hard-copy paper manuscripts; all manuscripts must be submitted electronically. This method of submission results in much faster handling of your manuscript, fewer handling errors, and allows you to track the handling progress of your manuscript at any time.
Manuscripts must be submitted as a Microsoft Word or other word processing document (filetype “.doc” or “.rtf”). Your computer system must be equipped with: (1) Up-to-date version of a common web browser, Java-enabled (2) The most current version of Adobe Acrobat Reader—free installation; (3) E-mail capability.
- Enter <http://mc.manuscriptcentral.com/jfs>
- Instructions will inform you how to create an account and log in. Your default login ID is your email address. (*Always use the same account initially created; do not create new accounts with new submissions.*)
- At an appropriate point in the submission procedure, you will be asked to select a journal section or separate journal in which you would like your article to appear.

Note: This site was designed for the *Journal of Food Science*, but has been modified to accommodate the *Journal of Food Science Education* and *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

See the [Manuscript Submission](#) page for more detailed instructions.

Selecting a Journal or Journal Section

- If your article is a short review for *JFS* (please prearrange with *JFS* Scientific Editor Daryl Lund), select Concise Reviews and Hypotheses in Food Science [Section 3].
- If your article is a report on original research, choose one the seven *JFS* research sections (Food Chemistry; Food Engineering and Physical Properties; Food Microbiology and Safety; Sensory and Food Quality; Nanoscale Food Science, Engineering, and Technology; Health, Nutrition, and Food; Toxicology and Chemical Food Safety) [Sections 4–10].
- If your article is education-related, intended for the online-only *Journal of Food Science Education* select Education [Section 1].
- If your article is an extended review for the online-only journal, *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety* (please prearrange with Scientific Editor Manfred Kroger), select this section [Section 2].

Other Requirements

- To assist in the review process, the SE, AE, or reviewer may request the author to submit the original data.

- Figures (with captions) and tables (with captions) should be clearly labeled and inserted near where they are first mentioned in the text or at the end, after the references.
- When prompted to do so, please provide the names, titles, and contact information (phone and fax number; postal and e-mail addresses) for up to 4 individuals you consider appropriate referees for your manuscript. Nonpreferred referees may also be named.
- *Do not install a security code password on your files!* If you do, your information cannot be reviewed and will be returned to you for removal of the security setting.

Checking on the Status of Your Manuscript Electronically

During the submission process, you may track the progress of your manuscript at any time by logging onto ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jfs>). For this purpose, you will need your User ID, your password, and your manuscript number. After acceptance, upon receipt of your proof, you will receive further information on tracking production of your paper through Wiley-Blackwell's Author Services.

Peer Review

All submitted manuscripts are screened by the section's Scientific Editor for importance, substance, appropriateness for the journal, general scientific quality, and amount of new information provided. Those failing to meet current standards are rejected without further review. Those meeting these initial standards are sent to expert referees for peer review (except for Letters to the Editor). Referees' identities are not disclosed to the author. Author identities are disclosed to the referees. When the initial review is complete, the Associate Editor will send you the referees' suggestions along with his or her suggestions. You are expected to respond to all suggestions either by making appropriate revisions or stating why the suggestions are unreasonable. The Associate Editor will consider your revisions, and provide the Scientific Editor with a recommendation to accept, revise, or reject your manuscript. If a second revision of a manuscript is still not satisfactory, it may be rejected (but may thereafter re-enter the peer review process if sufficiently updated and revised). The Scientific Editor informs the author of the final decision.

Accepted manuscripts

- Once you receive your acceptance letter email with detailed instructions, send in your completed copyright assignment form. We will not begin production until we have that form on file.
- We will use the accepted files on ScholarOne Manuscripts for production. If there are any problems with your files, we will contact you. If there are final post-acceptance changes (suggested by the editor) to your paper, the following items must be e-mailed as an attachment to akferguson@ift.org: (1) the corrected manuscript, including tables and figure captions, filetype Document (.doc) or Rich Text Format (.rtf). Include all text, tables, and figure captions in a single document; submit the

figures themselves as separate files; (2) Electronic versions of any figures (if we have not previously received them and if there are no changes), in high-resolution TIFF, EPS, or PDF format. Submission in this manner is necessary to enable copy-editing and production.

- Label all electronic files or hard-copy figures with the assigned 8-digit JFS manuscript ID number and figure numbers.
- After production of your manuscript begins, you will receive page proofs in PDF format, via e-mail, for checking. You are responsible for all statements appearing in the page proof. If you are not available to review the page proof, you should authorize someone else to carefully study the page proof for errors.
- You will be informed of the estimated date of publication at the time you receive page proofs for correction.

Inquiries regarding status of the manuscript

Direct inquiries to: Amanda Ferguson, Manager, IFT Scientific Journals; Institute of Food Technologists, 525 W. Van Buren, Suite 1000, Chicago, IL 60607; Telephone: (312) 604-0276; Fax: (312) 596-5676; E-mail: akferguson@ift.org.

IMPORTANT NOTICE

Your manuscript can only move through the submission, acceptance, and publishing phases *if* your user information is accurate and complete. If you move, change employment or change your e-mail address or fax number, let us know *immediately*. Please take time to look at your account (at <http://mc.manuscriptcentral.com/jfs>) and verify that your information is up to date.

Publication of your manuscript will halt if we cannot reach you. It is *your* responsibility to contact us with any changes in your contact information.

Policy Guidelines for Handling Manuscripts Dealing with Sensitive Issues

The following statement was adopted by IFT and the Scientific Editors to address the issue of potential inappropriate use of information published in IFT's scientific journals. We realize this is a sensitive issue between access to information, academic freedom, and personal and community safety. We have tried to craft a statement and process that carefully walks the fine line between these potentially conflicting forces. Since this is a dynamic time, we would appreciate hearing from you if you have concerns.

ANEXO 7

Foto 1 – Recipientes inadecuados (H1)

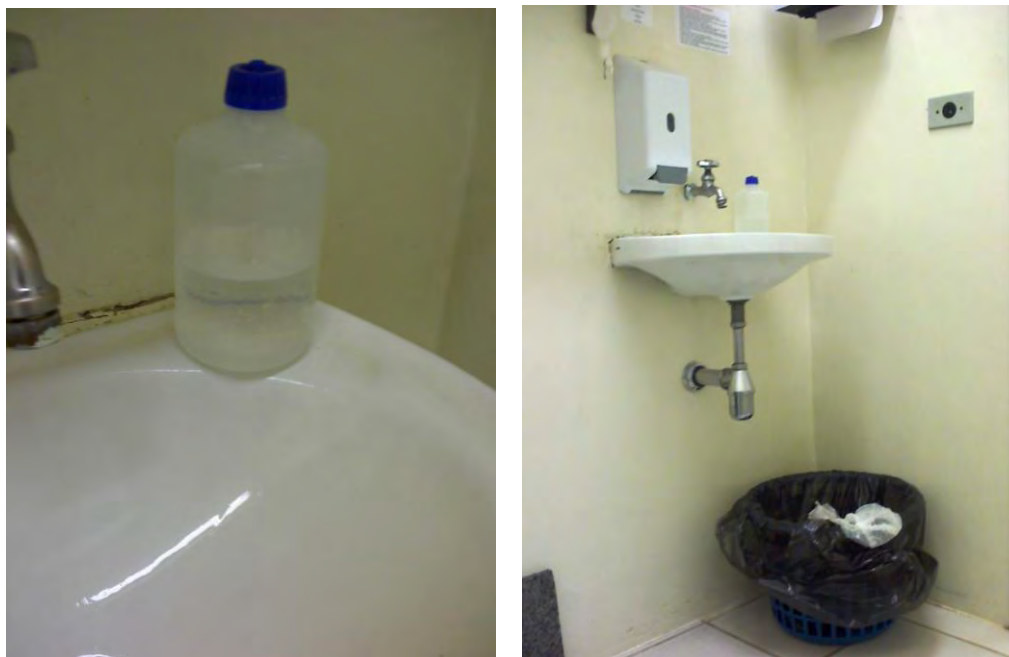


Foto 2 – Recipientes inadecuados (H2)



Foto 3 – Detergente diluído (H2)



Foto 4 – Esponja e pano úmido expostos ao ambiente (H2)



Foto 5 – Utensílios sobre a bacada sem proteção contra insetos (H2)



Foto 6 – Panela com água fervida e filtro instalado após orientação (H1)



Foto 7 – Janela aberta com tela de proteção (H2)



Foto 8 – Janela localizada sobre a bancada de preparo das dietas (H2)

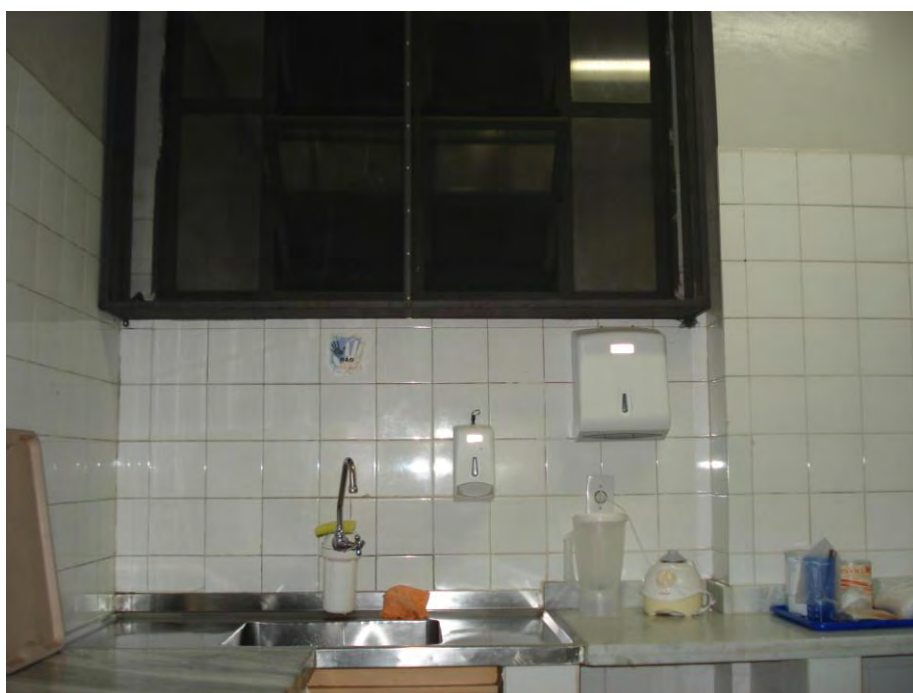


Foto 9 – Lixeira com acionamento de pedal danificado (H2)

