



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

MONIKE DA SILVA OLIVEIRA

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS DOS
QUEIJOS MINAS FRESVAL CLANDESTINOS COMERCIALIZADOS NO NORTE
DO TOCANTINS**

Araguaína-TO
2020

MONIKE DA SILVA OLIVEIRA

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS DOS
QUEIJOS MINAS FRESVAL CLANDESTINOS COMERCIALIZADOS NO NORTE
DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientadora: Prof^a Dra. Bruna Alexandrino

Co-orientador: Prof^o Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Co-orientadora: Prof^a Dra. Silvia Minharro Barbosa

Araguaína-TO

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O48q Oliveira, Monike da Silva Oliveira.
Qualidade Higiênico-sanitária e perigos microbiológicos dos queijos minas frescal clandestinos comercializados no norte do Tocantins.. / Monike da Silva Oliveira Oliveira. – Araguaína, TO, 2020.
67 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2020.
Orientadora : Bruna Alexandrino Alexandrino
Coorientador: José Carlos Ribeiro Júnior Ribeiro Junior
1. EPEC. 2. EHEC. 3. STEC. 4. DTAs. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MONIKE DA SILVA OLIVEIRA

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS DOS
QUEIJOS MINAS FRESCAL CLANDESTINOS COMERCIALIZADOS NO NORTE
DO TOCANTINS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Data da Aprovação: 09/03/2020

Banca examinadora:

Bruna Alexandrino

Prof.^a Dra. Bruna Alexandrino, Orientadora, UFT.

José Carlos Ribeiro Junior

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Junior, Examinador, UFT

Cátia Maria de Oliveira Lobo

Prof.^a Dra. Cátia Maria de O. Lobo, Examinadora, UFT.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde, paz, proteção e todas as bênçãos derramadas no decorrer da minha vida.

Ao esposo Márcio pelo amor, compreensão, paciência e apoio para iniciar e concluir o mestrado. Aos meus meninos Marcel e Dalton que pareciam adivinhar quando eu estava ocupada escrevendo e eles no meu encaixo para brincar e jogar futebol, não me fazendo esquecer que a dedicação à família vem em primeiro lugar sempre.

Ao meu pai Martins e mãe Chiquinha que sempre me deram amor e todo suporte, ensinando que a educação a base para mudar a realidade em que vivemos.

À minha orientadora Prof^a Dra. Bruna sempre muito atenciosa e gentil, e que aceitou o desafio de tocar o experimento mesmo esperando o bebê Gustavo! Meu muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof^o Dr. José Carlos que não mediu esforços para que o experimento tivesse sucesso, sempre teve paciência em ensinar a rotina do laboratório e metodologias, além de ter tornado um grande amigo e colega de profissão.

À técnica Cristiane que me ensinou o que eu sei hoje de prática laboratorial (não desmerecendo o Prof. José rsrs) e foi até o fim comigo no experimento, meu imenso agradecimento pela ajuda e atenção incondicional.

Ao colega de mestrado Méd. Vet. Isac Gabriel (menino Isac) que por inúmeras vezes me ajudou na bancada do laboratório, causando a muitas risadas e deixando a rotina muito mais leve.

Aos estagiários Bianca (menina Bianca), Yron, Aelton, Carol e Thayná que foram fundamentais na execução do projeto e mostraram o que é uma equipe de sucesso. Tenho certeza que as amizades construídas por toda equipe dos laboratórios renderão muitos frutos, me deixando muito feliz em fazer parte dela.

Ao meu chefe da Vigilância Sanitária Cláudio Barbosa pelo incentivo para minha qualificação através do mestrado, sempre torcendo para que os frutos desta capacitação tornem nosso departamento ainda mais produtivo e preparado para os desafios na saúde pública.

Ao INCT/Leite – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Cadeia Produtiva do Leite pelo suporte nos reagentes de biologia molecular.

Muito Obrigada!

QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E PERIGOS MICROBIOLÓGICOS DOS QUEIJOS MINAS FRESCAL CLANDESTINOS COMERCIALIZADOS NO NORTE DO TOCANTINS

RESUMO - O queijo é um produto popular que compõe quase que diariamente a dieta da população. É rico em nutrientes e por isso também um excelente meio de multiplicação de microrganismos, inclusive os patogênicos. A contaminação microbiológica desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária e a presença de patógenos bacterianos nos queijos Minas Frescal clandestinos comercializado nas feiras livres do município de Araguaína – TO. Foram coletadas 21 amostras avaliando-se a presença de coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT), *Escherichia coli* e os patótipos EPEC, STEC e EHEC, estafilococos coagulase positiva (ECP), *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. O resultado demonstrou que 100% das amostras de queijo estavam em desacordo com o padrão máximo de CT e CTT previstos na legislação que regulamenta o controle da qualidade desse alimento. Além desses grupos, 85,71% das amostras encontravam-se acima do limite máximo previsto para ECP, com contaminação satisfatória para a potencial produção de toxinas estafilocócicas em quantidade suficiente para provocar intoxicação alimentar. Na pesquisa de *E. coli* diarréiogênicas 52,38%, 66,6% e 4,76% das amostras foram positivas para EPEC, STEC e EHEC, respectivamente, indicando contaminação de origem fecal nas amostras e pela potencial presença de outros enteropatógenos. Em nenhuma amostra foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A alta contagem de coliformes totais e termotolerantes encontrados nas amostras demonstram condição sanitária insatisfatória na produção, armazenamento e/ou comercialização deste alimento. A presença de EPEC, STEC e EHEC e estafilococos coagulase positiva em concentrações em que há a produção de enterotoxinas, evidenciam o iminente risco à saúde pelo consumo do queijo Minas Frescal clandestino.

Palavras-chave: Saúde pública. EPEC. EHEC. STEC. DTAs.

HYGIENIC-HEALTH QUALITY AND MICROBIOLOGICAL HARZAD OF CLANDESTINE MINAS FRESCAL CHEESE COMMERCIALIZED IN NORTH TOCANTINS

ABSTRACT

Cheese is a popular product that makes up the daily diet of the population almost daily. It is a product rich in nutrients and therefore also an excellent substract of multiplication of microorganisms, including pathogens. The microbiological contamination of these products assumes prominent relevance to industry, economic losses and public health, due to the risk of causing foodborne diseases. The ain of this research was to evaluate the hygienic-sanitary quality and the presence of bacterial pathogens in the clandestine Minas Frescal cheeses sold in the free markets of Araguaína – TO, Brazil. Twenty-one samples were collected evaluating the presence of total (TC) and thermotolerant (CTT) coliforms, *Escherichia coli* and the pathotypes EPEC, STEC and EHEC, coagulase positive staphylococci (CPS), *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The results showed that 100% of the cheese samples were in disagreement with the maximum standard of CT and CTT in the Brazilian legislation that regulates the quality control of this food. In addition to these groups, 85.71% of the samples were above the maximum limit for, with sufficient contamination for the potential production of enough staphylococcal toxins to cause food poisoning. In the study of diarrheagenic *E. coli* 52.38%, 66.6% and 4.76% of the samples were positive for EPEC, STEC and EHEC respectively, indicating contamination of fecal origin in samples and potential consumer risk. No *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes* were deteced in those cheese samples. The high count of total and thermotolerant coliforms found in the samples demonstrates unsatisfactory sanitary condition in the production, storage and /or commercialization of this food. The presence of EPEC, STEC and EHEC and coagulase positive staphylococci at concentrations that produce enterotoxin, shows the health risk from the imminent consumption of Minas Frescal cheese.

Key words: Public health. EPEC. EHEC. STEC. Foodborne diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Colônias com brilho verde metálico (setas) em ágar eosina-azul de metileno, características de colônias <i>E. coli</i> . isolados a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	21
Figura 2	Teste da coagulase <i>in vitro</i> , para identificar estirpes de estafilococos coagulase positiva, realizado a com isolados obtidos a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	27
Figura 3	Colônias com centro preto em ágar Salmonella-Shigella, típicas de <i>Salmonella</i> spp. isolados a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	29
Figura 4	Colônias típicas, ou seja, colônias negras com halo de precipitação, de <i>Staphylococcus</i> spp. em ágar Baird-Parker, isolados a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	36
Figura 5	Representação de PCR para gene <i>stx1</i> de isolados de <i>E. coli</i> obtidos a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	45
Quadro 1	Consolidado de surtos de DTAs notificados no município de Araguaína-TO entre os anos de 2009 e 2017.	15
Quadro 2	Pesquisas realizadas avaliando a presença de <i>Escherichia coli</i> patogênica em produtos lácteos.	19
Quadro 3	Caracterização genética dos grupos de <i>E. coli</i> diarreiogênicas (DEC).	23
Quadro 4	Principais toxinas estafilocócicas estudadas.	28
Quadro 5	Primers e as condições de amplificação utilizados.	39
Quadro 6	Quantidade de componentes (por μL) para amostra em uma reação de 25 μL .	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contagem de coliformes totais e termotolerantes obtidos a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	41
Tabela 2	Consolidado dos resultados de PCR para identificação dos genes <i>eaeA</i> , <i>stx1</i> e <i>stx2</i> das estirpes de 476 <i>Escherichia coli</i> isoladas de 21 queijos tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	44
Tabela 3	Resultados de estafilococos coagulase positiva em 21 amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.	47

LISTA DE ABREVIACOES

EMB	gar eosina-azul de metileno
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
SINAN/MS	Sistema de Informao de Agravos de Notificao/Ministério da Saúde
SIH/MS	Sistema de Informao Hospitalares/Ministério da Saúde
LPS	Lipopolissacarídeo
DEC	<i>E. coli</i> diarreianognica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de Shiga-toxina
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágicas
EPECt	<i>E. coli</i> enteropatognica típica
EPECa	<i>E. coli</i> enteropatognica atípica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxignica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
AIEC	<i>E. coli</i> aderente invasivo
EAHEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa hemorrágica
LT	Toxina lbil
ST	Toxina estvel
pEAE	Aderncia plasmidial
PCR	Reao em cadeia da polimerase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resoluo de Diretoria Colegiada
EE	Enterotoxinas estafilocócicas
ECP	Estafilococos coagulase positiva
NMP	Número Mais Provável
PCA	gar Padrão para Contagem ou ágar contagem de placas
BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Corao
SHU	Síndrome hemolítico-urmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 O queijo.....	17
3.2 A importância do queijo na economia local	17
3.3 Queijos relacionados à saúde pública	17
3.4 Microrganismos indicadores comumente isolados nos alimentos	20
3.5 <i>Escherichia coli</i>	21
3.6 <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
3.7 <i>Salmonella</i> spp.....	28
3.8 <i>Listeria</i> spp.....	30
3.9 Prevenção e tratamento das DTAs	32
4 METODOLOGIA	34
4.1 Amostragem	34
4.2 Coliformes a 30°C, a 45°C e <i>Escherichia coli</i>.....	34
4.3 Estafilococos coagulase positiva (ECP).....	35
4.4 <i>Salmonella</i> spp.....	36
4.5 <i>Listeria</i> spp.....	37
4.6 Recuperação dos microrganismos.....	37
4.7 Confirmação dos isolados.....	37
4.8 Estatística	40
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	41
5.1 Coliformes totais e termotolerantes.....	41
5.2 <i>Escherichia coli</i>	43
5.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	47
5.4 <i>Salmonella</i> spp.....	50
5.5 <i>Listeria</i> spp.....	51
6 CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS	54
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos da natureza por apresentar elevado valor nutritivo, ser constituído de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas, água, além de compostos com alta digestibilidade, componentes que o tornam fundamental para a dieta humana, fato pelo qual é amplamente comercializado e consumido pela população, sobretudo por crianças e idosos (MARQUES; COELHO; SOARES, 2005; SALVADOR et al., 2012).

O queijo Minas Frescal é um alimento bastante popular de preço acessível, obtido através da coagulação enzimática do leite, complementada ou não com bactérias lácticas específicas. Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um meio de ligação para os patógenos de origem alimentar e, sobretudo, os queijos frescos clandestinos, isto é, desprovidos de fiscalização sanitária, pois frequentemente são produzidos a partir de leite cru e também por não sofrerem processo de maturação (FEITOSA; BORGES; NASSU, 2003).

A produção informal de queijos é frequente no Brasil, principalmente o tipo Minas Frescal. Os produtores de leite, com predomínio dos pequenos, encontram na produção de queijos uma forma de agregar valor ao produto (LOPES et al., 2006). Esse processo geralmente é realizado de forma rudimentar, sem o controle higiênico-sanitário determinado pelas legislações brasileiras para garantir a sua segurança para o consumo. O fato de serem produzidos com leite cru, não pasteurizado, já implica em potencial risco ao seu consumo, devido a não eliminação da microbiota patogênica que pode estar presente, muitas vezes oriunda de condições insatisfatórias de obtenção da matéria-prima ou de processos infecciosos relacionados com a sanidade do animal (AMORIM et al., 2014).

O leite constitui também um excelente meio para a proliferação de vários grupos de microrganismos desejáveis, notadamente benéficos ao homem, visto que eles participam ativamente de alterações físicas, químicas e organolépticas que ocorrem no leite ao se preparar diversos derivados lácteos (VIDAL, 2018). Por outro lado, há a possibilidade de microrganismos indesejáveis que podem acarretar defeitos físico-químicos e organolépticos, além de problemas econômicos e de saúde pública, limitando também a durabilidade do leite e seus derivados (CARVALHO, 2010). A caracterização exata dos patógenos se faz imprescindível para a detecção dos locais de contaminação do processamento, além de permitir o monitoramento da disseminação de estirpes bacterianas (MEDEIROS et al., 2013).

Com o crescimento da economia tem aumentado também a demanda por produtos mais nobres e com certificações de qualidade (LEITE, 2012). A Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA) através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2001 (BRASIL, 2001) é a legislação brasileira que institui parâmetros máximos permitidos de microrganismos presentes nos queijos para fins de registro e fiscalização, a saber: coliformes a 45 °C/g (5×10^3 NMP/g), estafilococos coagulase positiva/g (5×10^3 NMP/g), ausência de *Salmonella* spp. em 25 g e *L. monocytogenes* em 25 g, qualificando os produtos em condições microbiológicas satisfatórias ou não (BRASIL, 2001).

Enterotoxinas podem ser produzidas a partir de estafilococos isolados de humanos, indicando que as DTAs podem indiretamente, ser ocasionadas pelos manipuladores de alimentos; o processo de aquecimento utilizado na pasteurização do leite inativa os *Staphylococcus*, mas não as enterotoxinas previamente produzidas, que permanecem ativas nos alimentos por um longo período (CARMO et al., 2002).

Os autores Almeida e Franco (2003) destacam que a contaminação microbiana de queijos merece atenção ao levar em conta que bactérias patogênicas e enterotoxigênicas, como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* são comumente encontradas em derivados lácteos.

Salmonella spp. ocupa posição de destaque entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), e os produtos lácteos ainda são um dos mais importantes veículos de sua transmissão, sendo os queijos frescos clandestinos os que apresentam maiores perigos de causar a enfermidade (VIDAL, 2018). A contaminação destes por esse agente tem sido atribuída, principalmente, ao consumo de leite e derivados lácteos sem tratamentos térmicos e/ou com falhas nesses processos, ou ainda contaminações pós-processamento (VIDAL, 2018).

Diversos surtos de doenças graves têm sido associados à ingestão de produtos lácteos, relacionados à presença de *Listeria monocytogenes* (COSTA; LIMA; RABELO, 2002). A frequência dos casos de listeriose veiculados por queijos evidencia a importância desse alimento e outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* spp. (CATÃO; CEBALUS, 2001).

A má qualidade na produção pode ser apontada pela presença da *Escherichia coli* (*E. coli*), pois é um microrganismo indicador de contaminação fecal no produto (SILVA et al., 2017). Segundo Silva e Silva (2005), os principais sintomas clínicos da doença causada por *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em humanos são diarreia aquosa acompanhada de febre, mal-estar e vômitos. EPEC é declarada como uma das principais causas da diarreia desde 1940 e continua a ser relacionada a casos esporádicos de surtos de diarreia infantil (SOUZA et al., 2016).

De acordo com Amorim et al. (2014), que realizaram pesquisa com consumidores, a maioria prefere o sabor dos queijos informais comercializados em feiras e desconhecem a origem do produto e o risco associado aos mesmos.

Ribeiro Júnior et al. (2019) ressaltam que o leite e produtos lácteos previamente pasteurizados oferecem segurança alimentar, enquanto os produzidos a partir de leite cru representam risco potencial à saúde pela presença de enteropatógenos, recomendando que o consumo destes tipos de produtos seja evitado.

A presença de patógenos como *E. coli* (DE CAMPOS et al., 2018), *Staphylococcus aureus* produtor de toxinas (SATO'O et al., 2014), *L. monocytogenes* (KOBAYASHI et al., 2017) e *Salmonella* spp. (ADHIKARI et al., 2018) nos produtos alimentícios como queijo, por exemplo, pode causar severos casos de intoxicação e doenças de origem alimentar, sendo sua ingestão um risco iminente para a saúde do consumidor.

O ajustamento e melhoria do processo de produção e comercialização dos queijos são temas de saúde pública, visto a necessidade de abastecer o mercado de produtos que ofereçam segurança ao consumidor, fator que também permite ao produtor a padronização e uma maior agregação de valor aos seus queijos, fortalecendo ainda mais este comércio (FERNANDES et al., 2013).

Além disso, é importante que os órgãos de fiscalização estabeleçam medidas que elucidem e conscientizem os produtores, os comerciantes e os consumidores de forma a coibir a comercialização de produtos que possam representar riscos à saúde pública (SILVA et al., 2013).

A conhecimento da situação epidemiológica dos casos de DTAs no município de Araguaína-TO indicada no quadro 1, justifica a realização desta pesquisa. *S. aureus*, *Salmonella* spp e *E. coli* são os principais agentes etiológicos envolvidos nos surtos e podem estar presente nos queijos clandestinos comercializados no município, sendo necessário avaliar a qualidade microbiológica e o risco do consumo deste alimento.

Quadro 1: Consolidado de surtos de DTAs notificados no município de Araguaína-TO entre os anos de 2009 e 2017.

Data do surto	Local de ocorrência	Nº Comensais expostos	Nº Comensais doentes	Nº de Internações	Sexo		Faixa etária						Nº de Óbito	Critério de Confirmação	Agente Etiológico	
					M	F	<1	1 a 4	5 a 9	10 a 19	20 a 49	+ 50				Total
30/05/09	CAT SESI	122	78	78	37	41	0	8	20	16	29	5	0	0	Laboratorial Clínico Bromatológico	Toxina produzida por <i>Staphylococcus aureus</i>
14/08/09	Residência	10	8	8	5	3	0	2	3	2	0	1	0	0	Clínico Epidemiológico	Toxina produzida por <i>Staphylococcus aureus</i>
28/05/12	Escola	53	53	53	16	37	0	0	0	53	0	0	53	0	Laboratorial Clínico Bromatológico	Descartado
31/08/12	Escritório	07	07	07	01	06	0	0	0	1	6	0	7	0	Clínico Epidemiológico	Toxina produzida por <i>Staphylococcus aureus</i>
20/06/13	Hotel	04	04	04	01	03	0	0	0	0	4	0	4	0	Clínico Epidemiológico	Toxina produzida por <i>Staphylococcus aureus</i>
21/01/14	Canteiro de obras	24	19	15	19	0	0	0	0	0	19	0	19	0	Clínico Epidemiológico	Toxina produzida por <i>Bacillus cereus</i>
24/05/16	Escola	52	04	0	03	01	0	0	4	0	0	0	04	0	Laboratorial Bromatológico	<i>Salmonella spp</i>
01/08/16	Lanche	17	15	02	04	11	0	1	0	4	10	0	15	0	Laboratorial Bromatológico	<i>Escherichia coli</i>
25/08/17	Residência	04	03	02	02	01	0	1	1	1	0	0	03	0	Laboratorial Bromatológico	<i>Escherichia coli</i> e Toxina produzida por <i>Staphylococcus aureus</i>

Fonte: Comunicação pessoal com a Vigilância Epidemiológica de Araguaína-TO

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária do queijo tipo Minas Frescal informais e os perigos microbiológicos relacionados ao consumo destes produtos comercializados no município de Araguaína, norte do Tocantins.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar os indicadores da qualidade higiênica dos queijos Minas Frescal comercializados no município de Araguaína – coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva – conforme padrões legais previstos pela legislação;
- Verificar o risco microbiológico pela presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*;
- Pesquisar os genes que codificam a expressão de fator de virulência *eaeA*, *stx1* e *stx2*, das *E. coli* isoladas; e
- Criar subsídios para a criação de políticas públicas para a promoção de saúde dos consumidores.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O queijo

Considera-se queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela atuação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade adequada para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente preconizados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Compreende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua produção (BRASIL, 1996).

De acordo com a Portaria 352/97, o queijo Minas Frescal é classificado como semi-gordo e de muita alta umidade, tendo o leite a ser utilizado ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente, combinado ou não com outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto (BRASIL, 1997).

3.2 A importância do queijo na economia local

Segundo o IBGE (2016), o Tocantins no ano de 2015 produziu 385.563 milhões de litros de leite, gerando faturamento de 369.191 milhões de reais. Somente o município de Araguaína, no mesmo período, produziu mais de 5.654 milhões de litros, correspondendo a 7,5% da produção do Estado.

O queijo é um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil, sendo um em cada três litros de leite produzidos são destinados à fabricação deste produto. Em 2017, a produção atingiu 1 milhão de toneladas, com crescimento de 2% sobre o ano anterior. Segundo estimativas, o universo do queijo – entre produção local e importação – movimenta cerca de R\$ 18 bilhões por ano (EMBRAPA, 2018).

3.3 Queijos relacionados à saúde pública

O queijo Minas Frescal pelas suas próprias características como alto teor de umidade, associado com o baixo teor de sal e ausência de maturação, tornam esse tipo de queijo

susceptível a contaminação, causadas tanto pelo leite utilizado em sua produção, quanto por contaminações diretas ou cruzadas no pós-processamento (PASSOS et al., 2009).

No geral, o leite utilizado na fabricação de queijos informais, tanto frescal, quanto padrão, não passa por nenhum processo que elimine sujidades ou contaminações, e associada a manipulação excessiva e por vezes realizada por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene, pode ser um importante ponto de contaminação (AMORIM et al., 2014).

A contaminação microbiológica desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar DTAs (FEITOSA; BORGES; NASSU, 2003).

Queijos produzidos com leite cru e pasteurizados têm sido associados com vários surtos de DTAs. Entre 1998 e 2012, o queijo foi responsável por 97 surtos nos Estados Unidos, resultando em 2.112 enfermos, 221 hospitalizações e 10 mortes. Os focos remanescentes foram causados por bactérias *Salmonella enterica* (18,5%), *Campylobacter* spp. (13,6%), *L. monocytogenes* (12,3%), *S. aureus* (7,4%), *E. coli* produtora de Shiga-Toxina (4,9%), *Brucella* spp. (3,7%), *Shigella* spp. (2,5%), *Clostridium perfringens* (2,5%) e *Bacillus cereus* (1,2%) (MACHADO; RADHAHRISHNA; CUTTER, 2017).

As estimativas de gastos e impacto econômico em decorrência de DTAs são difíceis de serem quantificados, mas são suficientes para mostrar que essas doenças representam um peso para a economia. Os custos envolvem a diminuição de renda pessoal devido à perda de dias trabalhados, custos com tratamento médico, redução da produtividade, custo com ações de investigação do surto, diminuição nas vendas gerada pela insegurança dos consumidores que evitam comprar determinados produtos, dentre outros fatores (AMSON et al., 2006).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS) (BRASIL, 2019a) e Sistema de Informações Hospitalares (SIH/MS) (BRASIL, 2019b) de 2007 a 2017 houve 7.170 surtos de DTAs, com 126.712 doentes. Em 2017, o custo médio com internação hospitalar foi de R\$ 1.266,96/paciente, multiplicando essa cifra pela quantidade de indivíduos doentes tem-se quase R\$ 160,5 milhões de gastos apenas na assistência direta a esses doentes. O conhecimento dos patógenos causadores dessas enfermidades é de fundamental importância para que sejam traçadas estratégias de controle da ocorrência destas doenças.

A alta umidade de água no queijo Minas Frescal melhora as condições de sobrevivência de diversos patógenos. Entretanto nos queijos curados, isto é, com baixa atividade de água tem-se observado baixa presença de *E. coli* patogênicas (PENG et al.; 2012, OSAILI et al.; 2014; BELLIO et al. 2018).

A presença de agentes patogênicos de origem alimentar e agentes zoonóticos em alimentos produzidos com leite cru é uma fonte de preocupação para os serviços de inspeção e vigilância oficiais. Considerando a ampla aceitação de produtos alimentares artesanais, assim definidos em legislação específica, pelos consumidores, a avaliação da sua segurança é obrigatória, através de inspeção das fazendas produtoras e estabelecimento de diretrizes adequadas para a produção, garantindo assim a segurança para os consumidores (ANDRETTA et al., 2019).

Sendo as DTAs uma questão de saúde pública de ordem mundial, múltiplos pesquisadores têm buscado avaliar o risco microbiológico dos diversos alimentos, inclusive do queijo, por estar envolvido em surtos alimentares. O quadro 2 compila artigos científicos que analisaram a presença de *E. coli* patogênica em produtos lácteos com foco em queijos produzidos a partir de leite cru ou queijos clandestinos.

Quadro 2: Pesquisas realizadas avaliando a presença de *Escherichia coli* patogênica em produtos lácteos

Tipo queijo	Nº amostras	% amostras positivas	Nº isolados positivos	+ <i>eaeA</i> (%)	+ <i>stx</i> (%)	+ outros genes	País	Referência
Queijo suíço usando leite cru	1.502	5,7	-	0	29	09 <i>hlyA</i>	SUI	Zweifel et al., 2010
Queijo mussarela	32	1	-	0	1*	-	ITA	Nobili et al. 2016
Leite cru	06	2	-	0	2*	-	ITA	Nobili et al. 2016
Queijo Karish (leite cru)	55	74,5	89	0	2 (2,25)	(71) <i>astA</i> , <i>ehaa</i> , <i>apfA</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i>	EGY	Ombarak, et al 2016
Queijo Ras (leite cru)	60	21,7	22	0	0	(22) <i>astA</i> , <i>ehaA</i> , <i>apfA</i> , <i>cdt</i> , <i>cnf</i>	EGY	Ombarak, et al 2016
Leite cru	72	76,4	111	01 (0,9)	0	(86) <i>astA</i> , <i>ehaa</i> , <i>apfA</i> , <i>iha</i> , <i>hlyA</i>	EGY	Ombarak, et al 2016
Queijo de leite cru	147	28	39	01	0	02 (<i>iroN</i> , <i>ompT</i> , <i>hlyF</i> , <i>iss</i> , <i>iutA</i>)	BRA	De Campos et. al 2018.
Leite cru	80	-	205	20 (9,75)	0	(14) <i>bfpA</i>	BRA	Ribeiro Junior et al. 2019
Queijo informal	10	-	111	2 (1,8)	3	(1) <i>bfpA</i>	BRA	Ribeiro Junior et al. 2019
Queijo formal	10	-	3	0	0	-	BRA	Ribeiro Junior et al. 2019

Legenda: BRA – Brasil, EGY – Egito, ESP – Espanha, ITA – Itália, SUI – Suíça.

Fonte: Própria autora.

Assim, o queijo pode representar um risco à saúde dos consumidores se produzido a partir de leite de má qualidade, resultante da falta de cuidados higiênico-sanitários. (MEDEIROS et al., 2013).

3.4 Microrganismos indicadores comumente isolados nos alimentos

Segundo Pereira et al. (1999), os coliformes representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia* e *Citrobacter* são fermentadores de lactose pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e comumente utilizados como indicadores higiênico-sanitários em controle de qualidade de água e alimentos.

As bactérias do grupo coliforme são encontradas no trato intestinal do homem e de mamíferos, sendo incapazes de persistir por longo tempo em outros ambientes que não as fezes. Os coliformes a 45°C tem população predominantemente constituída por *E. coli* caracterizando um grupo de microrganismos indicativos de possível contaminação de origem fecal (OKURA, 2010). De acordo com Silva et al. (2017), as principais utilizações desses microrganismos como indicadores são:

- a) Enterobactérias e coliformes: indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, pois são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos de plantas de processamento, quando a sanitização é falha.
- b) Coliformes: indicadores de falha de processo ou contaminação pós-processo em alimentos pasteurizados, pois são facilmente destruídos pelo calor e não poderiam sobreviver ao tratamento térmico.
- c) *E coli*: indicador de contaminação fecal em alimentos “*in natura*”.
- d) Estafilococos coagulase positiva: indicadores da qualidade higienico-sanitária da manipulação dos alimentos, por ser pertencente à microbiota da epiderme de mamíferos.

O Ministério da Saúde, através da RDC 12/2001 considerou os padrões “coliformes de origem fecal” e “coliformes termotolerantes” como equivalente a coliformes a 45 °C (OKURA, 2010). Nesta mesma resolução, estabeleceu um valor limite de acordo com a umidade do produto, sendo para queijos que apresentam teor de muita alta umidade (>55%), como o queijo Minas Frescal o valor aceitável de no máximo de 5×10^3 NMP/g de coliformes a 45 °C.

Para Almeida e Franco (2003), a presença de coliformes em queijos vem se tornando cada vez mais preocupante, pelo surgimento de surtos de toxinfecções alimentares por *E. coli* patogênica.

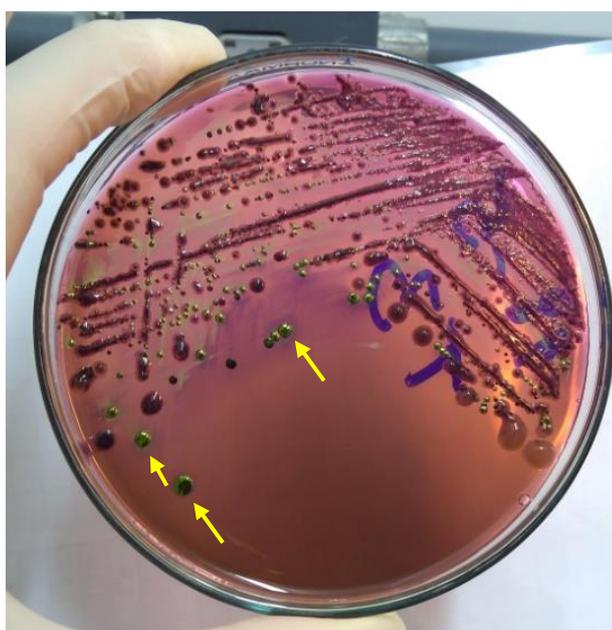
3.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria comumente encontrada no intestino de humanos e outros animais de sangue quente (SILVA et al., 2017). Enquanto a maioria das cepas é saprófita (SOUZA et al., 2016), algumas podem causar DTAs. A infecção por *E. coli* é geralmente transmitida através do consumo de água ou alimentos contaminados, como produtos de carne mal cozida e leite cru. Os sintomas da doença incluem cólicas abdominais, diarreia que podem ser sangrentas, além de poder ocorrer febre e vômito. Parte dos pacientes se recupera em 10 dias, embora, em alguns casos, a doença possa se tornar fatal (WHO, 2019a).

E. coli é caracterizada por um bastonete curto, Gram-negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5 μm por 2 a 6 μm , sendo a maioria móvel, devido a existência de flagelos peritríquios. A temperatura ótima de crescimento é em torno dos 37 °C (QUINN et al., 2005).

Além disso, são anaeróbios facultativos, pois possuem metabolismo respiratório e fermentativo, sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. Esta bactéria produz colônias de cor rosa em ágar MacConkey e com brilho metálico (figura 1) em ágar eosina-azul de metileno (EMB) (QUINN et al., 2005).

Figura 1: Colônias com brilho verde metálico (setas) em ágar eosina-azul de metileno, características de colônias *E. coli*. isoladas a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.



Legenda: colônia típica = seta amarela
Fonte: Própria autora.

E. coli é usada como um marcador para condições de contaminação e de higiene, durante o processamento ou pós-processamento de alimentos. A sua presença pode indicar a existência de agentes patogênicos entéricos (MORAES et al., 2009). Algumas estirpes de *E. coli* ainda podem adquirir genes de virulência e causar doenças (DE CAMPOS et al., 2018).

E. coli diarreio gênicas são as capazes de causar diarreia em homens e animais, diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas (NATARO; KAPER, 1998).

Segundo Rocha (2008), estes fatores compõem parte do corpo bacteriano, composto de estruturas antigênicas, que contribuem para a determinação dos sorogrupos de *E. coli*. Esta determinação é realizada por meio de antissoros e baseada na classificação que Kauffmann realizou em 1947, nos antígenos:

a) somáticos (*Öhne* – “O”): é um lipopolissacarídeo (LPS) que corresponde a um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas, termorresistente e divide-se em antígeno somático, o lipídeo A e Core (MAGALHÃES et al., 2007).

b) capsulares (*Kapsel* – “K”): antígeno capsular “K” é relacionado à resistência aos efeitos bactericidas do sistema complemento, devido à presença do ácido N-acetil melamínico da cápsula (BARCELOS, 2005).

c) flagelares (*Hauch* – “H”): antígeno flagelar “H” não é utilizado com frequência na identificação antigênica das cepas de *E. coli*. Sua composição é de natureza proteica e quando aquecido a 100 °C pode ser destruído. A presença de flagelo não tem sido correlacionada com a patogenicidade (BARCELOS, 2005).

d) fimbriais (*Fimbriae* – “F”): os antígenos fimbriais “F” são denominados adesinas, pili ou fímbrias, que recobrem a superfície bacteriana. São moléculas de natureza proteica capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas (BARCELOS, 2005).

A expressão deste fator de virulência é de fundamental importância no processo de aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro. Frequentemente as adesinas conferem especificidade da aderência da bactéria em relação a determinados tecidos e órgãos do hospedeiro (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

São conhecidos 177 antígenos somáticos (O), 100 capsulares (K) e 52 flagelares (H), embora existam ainda amostras rugosas, autoaglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total da cadeia de polissacarídeo (CAMPOS; TRABULSI, 2002; ROCHA, 2008).

Oito grupos de *E. coli* diarreioanogênica (DEC) são conhecidas, a saber: *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), que incluem o subgrupo de enterohemorrágicas (EHEC); *E.*

coli enteropatogênica típica e atípica (EPECt e EPECa); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* difusamente aderente (DAEC); e *E. coli* aderente invasivo (AIEC). *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) O104:H4 é um patótipo de *E. coli* emergente associado com surtos ocorridos na Alemanha em maio de 2011 (PARUSSOLO et al., 2019).

O quadro 3 relaciona os grupos de *E. coli* diarreianogênica (DEC) com a caracterização genética deste.

Quadro 3: Caracterização genética dos grupos de *E. coli* diarreioigênicas (DEC).

Nome	Sigla	Caracterização genética
<i>E. coli</i> produtora de Shiga-toxina	STEC	Genes <i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i>
<i>E. coli</i> enterohemorrágicas	EHEC	Gene <i>eaeA</i> simultaneamente com gene <i>stx</i>
<i>E. coli</i> enteropatogênica típica	EPECt	Gene <i>eaeA</i> + <i>bfpA</i>
<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica	EPECa	Gene <i>eaeA</i> – <i>bfpA</i>
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	ETEC	Genes de enterotoxinas LT (toxina lábil) e ST (toxina estável) e fatores de colonização
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC	Gene <i>ipaH</i> e <i>ial</i>
<i>E. coli</i> enteroagregativa	EAEC	Gene <i>aggR</i> , <i>aap</i> , e <i>AA probe</i>
<i>E. coli</i> difusamente aderente	DAEC	Ainda sem caracterização do gene
<i>E. coli</i> aderente invasivo	AIEC	Sem consenso entre cientistas sobre o gene
<i>E. coli</i> enteroagregativa hemorrágica (sorogrupo O104:H4)	EAHEC	Gene <i>stx2</i>

Fonte: Adaptado de Parussollo et al. (2019).

EPEC foi a primeira categoria reconhecida como diarreioigênica e está associada a casos esporádicos e surtos de diarreia infantil. Em 1995, EPEC foi classificada em típica e atípica e, até o momento, muito se tem pesquisado sobre as diferenças patogênicas e epidemiológicas destas duas subcategorias e sua similaridade com outras categorias (SOUZA et al., 2016). A estirpe de EPEC típica é caracterizada pela presença do fator de aderência plasmidial (*pEAE*) que codifica o pacote agregador de pili, enquanto a EPEC atípica não possui o *pEAE* (RIOS et al., 2019). A EPECt tem como principal reservatório a microbiota entérica humana (SOUZA et al., 2016).

Segundo Murray et al. (2014), EPEC são consideradas importantes causas de diarreia infantil em países pobres, a enfermidade é mais rara em adolescentes e adultos devido ao desenvolvimento de imunidade protetora. A doença é caracterizada pela ligação das bactérias as células epiteliais do intestino delgado com subsequência destruição das microvilosidades.

STEC são caracterizadas pela produção de citotoxinas nomeados toxina tipo Shiga, codificada pelos genes *stx1* e *stx2* (NATARO e KAPER, 1998; PATON e PATON, 1998). Estirpes STEC são encontradas no leite cru e queijos de leite cru (FARROKH et al., 2013) e são uma causa importante de surtos humanos, causando graves quadros de Síndrome Hemolítico-Urêmica (SHU) e trombocitopenia púrpura (PATON e PATON, 1998; MISZCZYCHA et al., 2014). Membros do grupo de STEC produtoras das toxinas *stx1* ou *stx2*, parte do mais virulento sorotipo O157:H7 e outros não-O157 são considerados crescentes problemas de saúde pública (FARROKH et al., 2013).

E. coli produtora de Shiga-toxina está envolvida em surtos de DTA do qual EHEC constitui um subtipo (CALDORIN et al., 2013), pois apresenta ao mesmo tempo os genes *eaeA* e *stx*. De acordo com Murray et al. (2014), a cepa EHEC expressa a toxina shiga-like que produz lesões nas células epiteliais. Após a entrada da toxina na célula, ela se liga ao ácido ribonucleico ribossomal (RNAr) e interrompe a síntese proteica, causando a destruição das vilosidades intestinais resultando em diminuição da absorção com aumento relativo da secreção de líquido.

Oh et al. (2017) identificaram que os principais sintomas dos 231 pacientes com EHEC foram diarreia sanguinolenta, febre, vômito e dor abdominal, com uma taxa maior de acometimento em crianças menores de nove anos e sem diferença significativa para o gênero.

Kumagai et al. (2015) constataram que a EHEC é a segunda maior causa de gastroenterite de origem alimentar no Japão sendo a maior causa de óbito, com uma estimativa de incidência anual de 80,7 casos por 100 mil habitantes, perdendo apenas para *Campylobacter* (92,5) e sendo maior que *Salmonella* spp. (31,7).

Na Europa, a EHEC tem sido relatada como causa de doença de origem alimentar envolvendo mais de 4.000 pacientes e 50 óbitos em 2011 (BIELASZEWSKA et al., 2011; RASKO et al., 2011), ocorridos mais especificamente na Alemanha. Na Noruega em 2006, 60 casos e um óbito foram registrados (L'ABE' E-LUND et al., 2012) todos com complicações decorrentes da SHU.

Miszczucha et al. (2014) lembra que para a transmissão de doença de origem alimentar seja bem-sucedida, cepas EHEC deve sobreviver a condições adversas encontradas não só durante o processamento do alimento, mas também durante o trânsito gastrointestinal em

humanos. Na digestão, o pH gástrico, secreções gastrointestinais e peristalse são fatores importantes que controlam o possível sucesso de um patógeno de origem alimentar.

Quanto à sobrevivência de *E. coli*, o estudo de Adhikari et al. (2018) demonstrou que a contaminação pós-processo de queijo em níveis elevados por um período mínimo de armazenagem de 60 dias a diferentes temperaturas não é suficiente para eliminar o risco associado com *E. coli* patogênica O157: H7. Além disso, notou-se que, mesmo aumentando o tempo de armazenagem até 365 dias, *E. coli* O157: H7 ainda permaneceu viável a 4,4 e 10 °C. Entretanto, a elevação de temperatura de armazenamento a 21.1 °C reduziu significativamente a população de microrganismos dentro de 30 a 60 dias, mostrando que tanto a temperatura de armazenamento quanto o tempo para queijo armazenado em recipiente hermeticamente fechado tem um efeito significativo sobre a sobrevivência de *E. coli* O157: H7.

A sobrevivência de *E. coli* sob refrigeração através de adaptações e crescimento microbiano em baixas temperaturas impõem desafio à segurança dos produtos alimentares altamente perecíveis como o queijo (SHARMA et al., 2019).

3.6 *Staphylococcus* spp.

S. aureus é considerada a mais importante espécie dentre as 29 identificadas do gênero em função da alta patogenicidade ao homem e estar frequentemente relacionada a DTAs (CUNHA; CUNHA, 2007). *S. aureus* pode causar gastroenterite em humanos através da ingestão de alimentos contaminados com o microrganismo que produz as enterotoxinas (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018).

O gênero *Staphylococcus* é composto por cocos esféricos que se dividem em mais de um plano formando arranjos que lembram cachos de uva. São Gram-positivos, imóveis, não esporogênicos, usualmente catalase positiva e oxidase negativa. São susceptíveis a lise por lisostafina e resistentes à lise por lisozimas. Estão associados à pele, glândulas e mucosas de animais de sangue quente (SCHLEIFER; BELL, 2009). *S. aureus* é uma bactéria comensal comum da pele, estimando persistir em 20% da população em geral e enquanto outros 60% são transportadores intermitentes (KLUYTMANS; WERTHEIM, 2005).

Os microrganismos desse gênero exibem um diversificado arsenal de fatores de patogenicidade, constituído por adesinas, enterotoxinas, hemolisinas, leucocidinas, produção de biofilmes, habilidade de invadir células epiteliais, dentre outros, os quais contribuem para colonizar e lesionar seus hospedeiros (KONEMAN et al., 2001).

As proteínas estafilocócicas podem ser pirogênicas e estão conectadas significativamente com enfermidades humanas, dentre elas a intoxicação alimentar e a síndrome do choque tóxico. A maioria dessas toxinas é produzida pelo *S. aureus* apesar de outras espécies terem também mostrado produzir enterotoxinas (PINCHUK et al., 2010).

Já foram descritas e purificadas 22 enterotoxinas estafilocócicas (EE), das quais, dez já foram envolvidas em intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI), sendo as clássicas, EEA à EEE, responsáveis por 95% dos surtos (VERNOZY-ROZAND et al., 2004). No quadro 4 estão relacionadas as mais comuns toxinas estafilocócicas e suas características.

Quadro 4: Principais toxinas estafilocócicas estudadas.

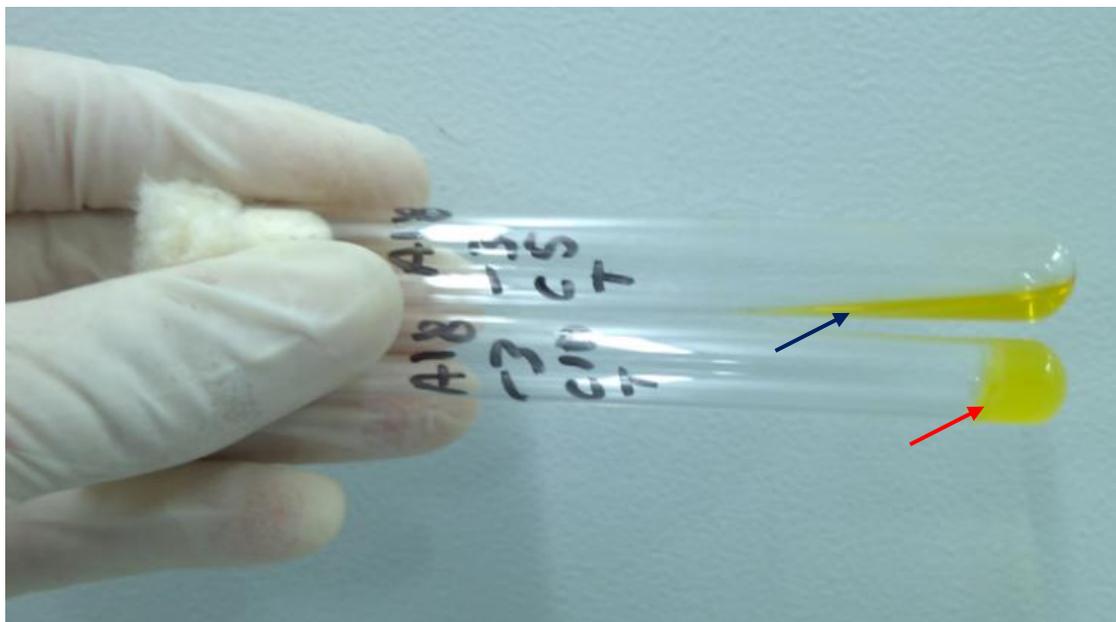
Toxina estafilocócica	Características
EEA	Mais comum toxina associada à intoxicação estafilocócica alimentar
EEB	Estudada como possível arma biológica
EEC	Comumente isolada de animais
EED, EEE e EEH	Relacionada à intoxicação alimentar
EEF	Associada à Síndrome do Choque Toxigênico
EEG e EEI	Menor importância na intoxicação alimentar

Fonte: Adaptado de Pinchuk et al. (2010).

Entre os fatores de patogenicidade, destaca-se a estafilocoagulase, uma proteína que possui ação enzimática e reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que converte o fibrinogênio em fibrina que coagula o plasma (WATANABE et al., 2005). O teste da coagulase *in vitro* (figura 2) é frequentemente utilizado para a identificação de isolados deste gênero dotados de maior potencial patogênico, geralmente de maior interesse clínico e epidemiológico, tanto na medicina humana, quanto na veterinária (COSTA et al., 2011).

A intoxicação alimentar estafilocócica causada pela ingestão de derivados lácteos como o queijo é comum, sendo continuamente relatada (CARMO et al., 2002; ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO et al., 2010; JOHLER et al., 2014; SATO'O et al., 2014).

Figura 2: Teste da coagulase *in vitro*, para identificar estirpes de estafilococos coagulase positiva realizado com isolados obtidos a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.



Legenda: Seta azul = plasma líquido (coagulase negativa), seta vermelha plasma coagulado (coagulase positiva)

Fonte: Própria autora.

Em investigações de surtos por intoxicação estafilocócica, a identificação da estirpe causadora pode ser um desafio, pois mesmo quando o microrganismo é inativado pelo calor e não pode ser isolado do item alimentar, as endotoxinas altamente resistentes formadas a partir de *S. aureus* podem causar DTAs (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

O estafilococos coagulase positiva (ECP), quando presente em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹ ou g⁻¹) e sob condições adequadas de temperatura, pH, atividade de água e O₂, produzem uma ou mais EE nos alimentos, as quais depois de ingeridas causam intoxicação (HOBBS; ROBERTS, 1999; BORGES et al., 2008).

Surtos de intoxicação alimentar estafilocócicas são uma das principais causas de doenças de origem alimentar na União Europeia e a sua notificação é obrigatória desde 2005. Critérios para a enumeração de estafilococos coagulase positiva e a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijos foram estabelecidas no Regulamento CE 2073/2005 (BELLIO et al., 2019). A RDC 12/2001 estabeleceu a quantidade máxima de (UFC/g) 10^3 *Staphylococcus* coagulase positiva como padrão microbiológico em queijo Minas Frescal.

3.7 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é uma das bactérias mais largamente distribuída na natureza, tendo o homem e os animais como seus principais reservatórios naturais, com ocorrência de sorotipos regionais. A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais (sendo as aves e os bovinos os maiores disseminadores), a existência de portadores assintomáticos e sua manutenção no ambiente e nos alimentos contribuem para que este microrganismo desempenhe um papel de destacada importância na saúde pública mundial, sendo alvo de programas permanentes de controle (SHINOHARA et al., 2008).

Este gênero pertence à família *Enterobacteriaceae*, bastonete Gram-negativo não esporogênico, anaeróbio facultativo e oxidase negativo (BRENNER; FARMER III, 2005). Segundo Popoff e Le Minor (2005), são usualmente móveis embora as cepas de sorotipo Gallinarium e Pullorum são normalmente imóveis; fermentam a glicose com a produção de ácido (100% das cepas) e gás (90% das cepas); não fermentam lactose e sacarose (99% das cepas); produzem H₂S (95% das cepas) e utilizam o citrato (95% das cepas). A *Salmonella* spp. produz colônia com centro preto em ágar Samonella-Shigella, pois o microrganismo produz sulfeto de hidrogênio que reage com o citrato férrico e o tiosulfeto de sódio, componentes do meio de cultura, resultando em sulfato ferroso de coloração enegrecida (figura 3).

Dentro das duas espécies *S. bongori* e *S. enterica*, existem mais de 2500 sorovares diferentes que foram identificados até o momento (BRASIL, 2011; WHO, 2019b). *S. entérica* ainda é subdividida em seis subespécies, que receberam as seguintes denominações: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (BRASIL, 2011).

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes números de sorovares tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (SILVA et al., 2017). A subespécie *S. enterica* representa o maior número de sorovares sendo responsável por 99% dos isolamentos, usualmente de animais de sangue quente (BRASIL, 2011). Por sua vez, a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis são os sorvares mais frequentemente isolados de surtos de origem alimentar em todo o mundo (HERIKSTAD; MOTARJEMI; TAUXE, 2002).

Figura 3: Colônias com centro preto em ágar Salmonella-Shigella, típicas de *Salmonella* spp. isoladas a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.



Legenda: colônia típica = seta vermelha
Fonte: Própria autora.

Salmonella spp. é o principal agente global de doenças de origem alimentar, com dezenas de milhões de casos por ano em todo o mundo (WHO, 2019b) inclusive no Brasil (SILVA et al., 2017); sendo uma entre quatro causas de diarreia no mundo inteiro e embora grandes surtos de *Samonella* spp. atraiam a atenção da mídia, 60 a 80% de todos os casos de salmonelose não são reconhecidos como parte de surto, sendo classificados como caso esporádico ou até mesmo não diagnosticados como tal (WHO, 2019b).

A dose de *Salmonella* spp. suficiente para causar doença varia de 10^5 a 10^8 células, contudo, em pacientes imunodeprimidos doses inferiores a 10^3 têm sido suficientes para que alguns sorovares causem surtos de DTA. A manifestação clínica inclui quadros entéricos agudos ou crônicos, além de localização extraintestinal, como infecções septicêmicas, osteomielite, artrite e hepatite (BRASIL, 2011).

O consumo de leite e seus derivados estão relacionados à importantes patógenos que causam doenças de origem alimentar, principalmente pela contaminação com *Salmonella* spp. (ELBAGORY; EMAN; EMAN et al., 2015).

Deve-se observar que em alimento com elevado teor lipídico, como ovos, leite e chocolate, as salmonelas se mantêm dentro dos glóbulos de gordura, ficando protegidas, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, fato que reduz a dose infectante do microrganismo para causar doença (FORSYTHE, 2002).

Quando se busca avaliar o risco sanitário de produto alimentício em geral, um dos microrganismos pesquisados é *Salmonella* spp., justamente por estar diretamente relacionada à surtos de origem alimentar. Por isso, a ANVISA através da RDC 12/2001 (BRASIL, 2001), regulamentou como ausência total desse microrganismo em 25g como parâmetro da segurança de diversos alimentos, inclusive o queijo.

Várias técnicas foram desenvolvidas para melhorar a detecção de sorovares de *Salmonella* spp., como o uso de meio de cultura seletivo e o teste de ELISA (SHANMUGASAMY; VELAYUTHAM; RAJESWAR, 2011), entretanto a amplificação *in vitro* do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma poderosa ferramenta de método diagnóstico (MALORNY et al., 2003). A PCR de diversos genes é utilizada, entretanto, o gene *invA* é o de eleição nos laboratórios diagnósticos para técnicas de base molecular por ser o mais simples e barato (SHANMUGASAMY; VELAYUTHAM; RAJESWAR, 2011).

É importante compreender a prevalência e as características de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de produtos de origem animal para o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes para controlar e prevenir infecções por este microrganismo em humanos e animais (LI; ZHOU; MIAO, 2017).

3.8 *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* spp. está amplamente distribuído na natureza e no ambiente de produção de alimentos (solo, água, vegetação, fezes de humanos e de animais saudáveis, esgoto, resíduos de abatedouros, ração animal, frango resfriado e congelado), mas a doença é transmitida fundamentalmente pelo consumo de alimentos contaminados por este microrganismo (McLAUHLIN; REES, 2009).

Seis são as espécies originalmente alocadas no gênero *Listeria* spp. incluindo *L. monocytogenes*, que são anaeróbias facultativas e necessitando da presença de um carboidrato de crescimento; produzem ácido, mas não gás a partir da glicose e outros carboidratos, catalase positiva e oxidase negativa. Não resistem à pasteurização clássica 63 °C/30 min e crescem na faixa de pH entre 6,0 e 9,0, suportando a presença de 10% de cloreto de sódio, sendo algumas cepas até 20% (McLAUHLIN; REES, 2009) e se multiplicam bem sob refrigeração (SILVA et al. 2017).

L. monocytogenes é considerado um patógeno oportunista, pois a ocorrência da infecção está relacionada principalmente as condições imunológicas dos indivíduos afetados: gestantes e idosos, estando estes últimos em ascensão na taxa de incidência de listeriose humana (CRUZ;

MARTINEZ; DESTRO, 2008; FAI et al., 2011). É provável que nas próximas décadas ocorra uma elevação destes casos, uma vez que o número de indivíduos susceptíveis e grupos vulneráveis na população tendem a crescer (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

Apontada como bactéria patogênica potencialmente letal para o homem e outros animais, *L. monocytogenes* está incluída, nas doenças de origem alimentar, em dois grupos segundo a classificação da *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*:

Grupo II – “doenças de sério perigo, não representando ameaça de morte e normalmente não deixando sequelas, mas incapacitando por períodos moderados”; e

Grupo IB – “doenças de severo perigo para a população restrita, representando ameaça de morte, sequelas crônicas ou longa duração” (ICMSF, 2002).

Há subnotificação e subdiagnóstico de surtos e/ou casos de listeriose no Brasil. Alguns pesquisadores realizaram estudos acerca da prevalência e característica de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no país, sem estabelecer, porém, algum tipo de relação com a via de transmissão do patógeno (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

Listeria spp. tem a capacidade de evitar a resposta do sistema imune humoral, por se multiplicar dentro da célula hospedeira, e escapar da resposta imune celular, por disseminar-se através da passagem célula-célula (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

São 13 as sorovarietades de *L. monocytogenes*, dentre as quais os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, responsáveis por 90% dos casos de listeriose humana, enquanto o sorotipo 4b é identificado em 50% destes (McLAUHLIN, 1990). Isso faz com que *Listeria* spp. seja uma séria ameaça à segurança alimentar, classificando-a entre os microrganismos que mais preocupam a indústria de alimentos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Em países com sistemas de vigilância atuantes, todas as cepas de *L. monocytogenes* são consideradas igualmente patogênicas (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008).

Estudos indicam que isolados de *L. monocytogenes* são capazes de produzir biofilmes em superfícies inertes (TAKAHASHI et al., 2011; IN LEE et al., 2017) e a proteção dessa estrutura de biofilme pode aumentar a resistência do microrganismo aos agentes sanitizantes (BELESSI et al., 2011). Muitas práticas inadequadas que ocorrem durante o processamento, permitem as contaminações pela sobrevivência e multiplicação de microrganismos patogênicos nos alimentos (AMSON et al. 2006).

Devido à capacidade de formar filmes nas superfícies das plantas de processamento de alimentos vários alimentos estão associados à contaminação por *L. monocytogenes*, como carne de aves (NALÉRIO et al. 2009), suínos (MONTEIRO et. al, 2014), leite cru e inadequadamente pasteurizado, queijos especialmente os frescos, derivados de carnes (linguiças cruas e salsichas tipo hot-dog), além de peixes crus, defumados e frutos do mar (SILVA et al. 2017).

O *iap*, marcador genético, foi previamente identificado por Bubert, Kohler e Goebel (1992) em ensaio de PCR para detectar bactérias do gênero *Listeria* spp. O gene *iap* do gênero *Listeria* codifica a proteína p60. Comparações de genes relacionados ao *iap* de diferentes espécies de *Listeria* indicaram regiões comuns e variáveis dentro desse gene, alcançado assim numa triagem, todas as espécies de *Listeria* spp., inclusive *L. monocytogenes* (BUBERT; KOHLER; GOEBEL, 1992).

3.9 Prevenção e tratamento das DTAs

Grande parte dos surtos alimentares está relacionado a alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, isto devido a dose infectante dos patógenos alimentares serem menor que a quantidade de microrganismos suficiente para degradar o alimento (OLIVEIRA et al. 2010).

A terapêutica para a maioria dos casos de DTAs é baseada nas medidas de suporte dependendo a sintomatologia do paciente, pois a doença é autolimitada. Entretanto, há exceções quando coexistem outras patologias como (i) botulismo, (ii) são geralmente fatais em recém-nascidos e em imunodeprimidos (listeriose), e (iii) podem ocasionar óbitos em crianças, idosos e adultos debilitados nas doenças provocadas por *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *E. coli* enterotoxigênica, *Shigella* spp. (BRASIL, 2010).

A prevenção indireta das DTAs se constitui na educação em saúde. Deve haver um processo educativo da sociedade, levando-se em consideração a cultura local, seus hábitos alimentares, condições de saúde e de vida, e utilizando das mais diversas ferramentas de comunicação, tais quais as rádios, tv, teatro (BRASIL, 2010), mídias digitais através dos perfis oficiais dos sites do governo, palestras nas escolas e centros comunitários.

Diretamente, a prevenção baseia-se na ingestão de água e alimentos seguros e na observação dos critérios como (BRASIL, 2020):

- Obter matérias primas de qualidade, com sanidade comprovada, com odor, cor e consistência característica;
- Tempo e temperatura adequados de cozimento, congelamento, reaquecimento de cada tipo de alimento;

- Aplicação das boas práticas de higiene e cuidados pessoais dos manipuladores;
- Higiene dos utensílios, equipamentos, instalações e ambientes, relacionados ao preparo e consumo dos alimentos.

As medidas de controle visam identificar e retirar, imediatamente, o alimento contaminado dos locais de produção e distribuição, para interromper a cadeia de transmissão e evitar a ocorrência de novos casos. Além disso, é fundamental a orientação aos pacientes para que não utilizem medicamentos sem indicação médica e a procurarem atendimento para realizar o tratamento adequado (BRASIL, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 Amostragem

As amostras analisadas foram de queijos tipo Minas Frescal, pois são os que oferecem maior risco microbiológico, comercializados no município de Araguaína/TO.

Foram adquiridas aleatoriamente 21 amostras de queijos, cada uma pesando entre 400g – 1.500g, nas feiras livres da cidade, entre abril e junho de 2019. As amostras foram identificadas, colocadas em saco plástico transparente de primeiro uso, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Higiene e Saúde Pública, da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Araguaína/TO, Brasil.

4.2 Coliformes a 30°C, a 45°C e *Escherichia coli*

Para a indicação de higiene das amostras, realizou-se a determinação do Número Mais Provável (NMP), averiguando a presença de coliformes totais a 30 °C para verificar a contaminação de origem ambiental, a presença de coliformes termotolerantes e *E. coli*, esta última, indicadora de contaminação de origem fecal.

Para as análises de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a metodologia do NMP APHA 9:2015 e APHA/AWWA/WEF 9221:2012 (HUNT, 2012; KORNACKI; GURTLER; STAWICK, 2015).

Para coliformes totais e termotolerantes foram retirados 25 g representativa da amostra e diluídos em 225 mL (diluição 10^{-1}) de solução de água peptonada tamponada, acondicionados em saco plástico estéril, e homogeneizado por 180 segundos em *Stomacher*. Foram realizadas posteriormente, mais oito diluições (10^{-2} a 10^{-8}) a partir da diluição inicial, passando-se 1 mL da diluição anterior em 9 mL de água peptonada tamponada.

Com o auxílio de uma pipeta foi inoculada, em triplicata, uma série de 1 mL de cada diluição em tubos contendo 10 mL de solução de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertido em cada um. Após a inoculação, os tubos foram incubados a 35 °C por 24-48 horas, seguido de observação de turvação do meio e produção de gás, indicativos de amostra positiva. Uma vez positiva, foi semeada uma alçada em cada um dos tubos da triplicata, contendo 10 mL de Caldo Verde Brilhante, os quais foram incubados a 35 °C, durante 24 a 48 horas, para a confirmação de coliformes totais; e simultaneamente foi semeada uma alçada em

triplicata de tubos contendo 10 mL de Caldo EC, incubados a 44,5 °C, em banho-maria por um período de 24 a 48 horas para confirmação de coliformes termotolerantes.

Para isolamento de *E. coli*, a partir de cada tubo de caldo EC com crescimento e produção de gás, foi feito estrias de esgotamento de uma alçada em ágar eosina-azul de metileno (EMB), incubando-se as placas a 35 °C por 18 a 24 horas. Colônias típicas foram repicadas em ágar Padrão para Contagem (PCA), incubando-se a 35 °C por 18 a 24 horas. Colônias isoladas do PCA foram repicadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) a 37 °C por 18 a 24 horas. A partir deste momento, 0,5 mL do BHI turvo foi armazenado com 0,5 mL de glicerina e congelado a -18 °C.

4.3 Estafilococos coagulase positiva (ECP)

A contagem de ECP foi realizada segundo a metodologia recomendada pela *International Organization for Standardization* (ISO) 6888-1:1999/Amd 1:2003. Nesta técnica, fez-se a homogeneização de 25 g da amostra com 225 mL de água peptonada obtendo-se a diluição 10^{-1} . Em seguida, fez-se diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , inoculando-se 1 mL da diluição anterior em 9 mL de água peptonada. Foram inoculados 0,1 mL destas diluições em placas contendo ágar Baird-Parker (BP), feitas em duplicata, incubando-as a 37°C por 24 a 48h \pm 2 horas. Colônias típicas, ou seja, colônias negras com halo de precipitação (figura 4) foram repicadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), incubando a 35 a 37 °C por 18 a 24 \pm 2 horas. A partir dessa nova cultura, foi feito o teste de coagulase para identificar os ECP.

A detecção da produção de coagulase seguiu a metodologia descrita por Costa et al. (2011) na qual utilizou-se plasma de equino. Calculou-se a população de bactérias segundo a ISO 7218:2007/Amd 1:2003 e os resultados foram expressos em UFC/g. Foram considerados os padrões de conformidade do queijo de muita alta umidade o padrão máximo previsto pela RDC nº12/2001: 5×10^3 ECP/g (BRASIL, 2001). Do caldo BHI contendo as colônias positivas no teste da coagulase, foram armazenados 0,5 mL em igual volume de glicerina e congelados a -18 °C.

Figura 4: Colônias típicas, ou seja, colônias negras com halo de precipitação, de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker, isolados a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.



Legenda: Setas vermelhas = colônias típicas (halo de precipitação).

Fonte: Própria autora.

4.4 *Salmonella* spp.

A análise qualitativa de *Salmonella* spp. realizou-se conforme a ISO 6579:2002/Amd 1:2007 modificada. A modificação consistiu na identificação molecular a partir dos isolados suspeitos do plaqueamento diferencial. Nesta técnica, primeiramente fez-se a fase de pré-enriquecimento, homogeneizando 25 g da amostra em 225 mL de Água Peptonada e incubando a 37 °C por 18 ± 2 horas. Para o enriquecimento seletivo, 1 mL da solução de pré-enriquecimento foi transferido para tubos de ensaio, contendo 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC) incubados a 37 °C por 24h ± 3 horas, e caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) incubando a 41,5 °C por 24 ± 3 horas em banho-maria. Uma alçada proveniente do caldo SC e do RVS foram estriadas por esgotamento em placas separadas contendo ágar Salmonella-Shigela (SS) (figura 2) e ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e incubados por 24 ± 3 horas a 37 °C. Colônias características de *Salmonella* spp. no ágar SS (colônias beges com centros pretos) e XLD (colônias vermelhas com centro preto) foram repicadas para o ágar PCA e incubadas a 37 °C por 24 horas. Colônias isoladas do PCA foram repicadas em caldo BHI a 37 °C por 18 a 24 horas. A partir deste momento 0,5 mL do BHI turvo foi armazenado com 0,5 mL de glicerina e congelado a -18 °C.

4.5 *Listeria* spp.

A pesquisa qualitativa de *Listeria monocytogenes* nas amostras de queijo realizou-se conforme preconizado pela ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 modificada. A modificação consistiu na identificação molecular a partir dos isolados suspeitos do plaqueamento diferencial. A técnica preconizou a homogeneização de 25 g de amostra com 225 mL de metade da concentração do caldo *Listeria Enrichment Broth* (HIMEDIA[®], Mumbai, Índia) como pré-enriquecimento, incubando a 37 °C por 24 ± 2 horas. Em seguida transferiu-se uma alçada para placa ágar Oxford e ágar *Listeria* Seletive incubando a 37 °C por 24 a 48 horas; e 0,1 mL em 10 mL de caldo *Listeria Enrichment Broth* (HIMEDIA[®], Mumbai, Índia) incubando a 37 °C por 24 ± 2 horas. Após essa incubação semeou-se em placa contendo ágar Oxford e ágar *Listeria* Seletive e incubou-se da mesma forma que o anterior. Passado o período de incubação, repicou-se colônias características do ágar *Listeria* Seletive (colônias brancas, pequenas) e Oxford (colônias brancas, pequenas, com halos pretos) em ágar PCA, incubando a 37 °C por 18 a 24 horas. Colônias isoladas do PCA foram repicadas em caldo BHI a 37 °C por 18 a 24 horas. Em seguida, 0,5 mL do BHI turvo foi armazenado com 0,5 mL de glicerina e congelado a -18 °C.

4.6 Recuperação dos microrganismos

Após o armazenamento dos isolados de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em glicerina, estes foram recuperados através da inoculação de 30 µL em 3 mL de caldo BHI incubando a 37 °C por 24 horas. Uma alçada do caldo BHI turvo foi estriado em ágar PCA e incubado em 37 °C por 24 horas. Uma colônia isolada foi inoculada novamente em caldo BHI e incubado conforme anterior. Cada isolado do BHI turvo seguiu-se para a extração de DNA.

4.7 Confirmação dos isolados

Os isolados foram confirmados através de técnica de PCR. Realizou-se o preparo para a extração de DNA conforme Ribeiro Júnior et al. (2016). Alíquotas de 1 mL do isolado oriundo do caldo BHI foram distribuídas em tubos de microcentrífuga e centrifugados durante 5 minutos a 14.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano suspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl a [10 mM]: EDTA [1 mM]) e submetidos a 15 minutos de ebulição. Posteriormente, os tubos de microcentrífuga foram colocados em banho de gelo (0 °C) por 15 minutos e em seguida realizada a centrifugação por 5 minutos a 14.500 rpm em temperatura

ambiente. Na próxima etapa, 50 µL de sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro tubo de eppendorf e armazenado a 20 °C negativos.

Na confirmação de *E. coli* patogênica seguiu-se a metodologia de Paton e Paton (1998) sendo feita a pesquisa de estirpes patogênicas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) contendo o gene *eaeA* e *E. coli* produtora de toxina *Shiga-like* (STEC) para a detecção dos genes *stx1* ou *stx2*, em PCR uniplex.

Para a confirmação de *Salmonella* spp. realizou-se a metodologia preconizada por Shanmugasamy, Velayutham e Rajeswar (2011), através da reação de PCR gênero-específica utilizando o gene *invA*, e os primers *S139* e *S141*.

Para a confirmação de *Listeria* spp., utilizou-se o método de PCR para determinação da espécie e gene de virulência *iap* conforme Chen e Knabel (2007). O quadro 5 demonstra os primers e as condições de amplificação utilizados. O quadro 6 consta as quantidades de cada componente de PCR ao qual as amostras foram adicionadas para amplificação.

Quadro 6: Quantidade de componentes (por µL) para amostra em uma reação de 25 µL.

Microrganismo	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.
Água ultrapura	18,35	18,05
Tampão (10x buffer)	2,5	2,5
Bases nitrogenadas (dNTP 10 mM/cada)	0,75	0,75
Cloreto magnésio (MgCl ₂ 50 mmol/L)	0,75	1,0
Primer Foward (10 pmol/L)	0,75	0,75
Primer Reverse (10 pmol/L)	0,75	0,75
Taq DNA Polimerase (5U/ µL)	0,15	0,2
DNA molde amostra (≈50 mg/µL)	0,5	0,5

Fonte: Própria autora

Os produtos da amplificação foram submetidos em eletroforese em gel de agarose a 1%, com tempo de corrida de 50 minutos e 90 volts de corrente elétrica constante. O gel foi corado em brometo de etídio (20 µg/mL) e visualizado por iluminação UV. O tamanho das bandas de DNA foi comparada com um marcador de escala de peso molecular 1 Kpb (Invitogen 1Kb Plus, Caslsbad, CA).

Quadro 5: Primers e as condições de amplificação utilizados.

Microrganismo	Primers*	Sequência (5'3')	Tamanho (pb)	Genes	Amplificação	Referência
<i>E. coli</i>	<i>eaeA</i> F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	<i>eaeA</i>	3 min. desnaturação inicial a 94 °C 32 ciclos de: 30 seg. desnaturação a 92 °C 30 seg. anelamento a 59 °C 1 min. extensão a 72 °C Extensão final por 1 min. 30 seg. a 72 °C	Paton e Paton (1998)
	<i>eaeA</i> R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG				
	<i>stx1</i> F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	<i>stx1</i>		
	<i>stx1</i> R	AGAACGCCCACTGAG ATCATC				
	<i>stx2</i> F	GGCACTGTCTGAAAT GCTCC	255	<i>stx2</i>		
	<i>stx2</i> R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>S139</i> F	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	<i>invA</i>	1min. desnaturação inicial a 94 °C 35 ciclos de: 1 min. desnaturação a 94 °C 30 seg. anelamento a 64 °C 30 seg. extensão a 72 °C Extensão final por 7 min. a 72 °C	Shanmugasamy, Velayutham e Rajeswar (2011)
	<i>S141</i> R	TCATCGCACCGT CAAAGGAACC				
<i>Listeria</i> spp.	<i>Iap</i> F	CGCAAGAAGAAATTGCCATC	1450-1600	<i>iap</i>	5 min. desnaturação inicial a 95 °C 40 ciclos de: 45 seg. desnaturação a 94 °C 45 seg. anelamento a 52 °C 2 min. extensão a 72 °C Extensão final por 10 min. a 72 °C	Chen e Knabel, (2007)
	<i>Iap</i> R	TCCGCGTTAGAAAAATTCCA				

Legenda: *F = forward, R = reverse

Fonte: Própria autora

4.8 Estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do *software* Microsoft Excel® versão 1910, sendo feitas análises de média e desvio padrão das contagens de CT e CTT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coliformes totais e termotolerantes

Na avaliação dos microrganismos indicadores de higiene, tais quais os coliformes totais (CT) ou a 30 °C e termotolerantes (CTT) ou 45 °C, os resultados constam na tabela 1.

Tabela 1: NMP de coliformes totais e termotolerantes obtidos a partir de 21 queijos tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

NMP/g coliformes totais (30°C)	Nº amostras	Limite aceitável pela legislação vigente (BRASIL, 1996)
até 10 ⁵	-	
>10 ⁵ a 10 ⁷	08	Até 10 ⁵ NMP/g
> 10 ⁷	13	
NMP/g coliformes termotolerantes (45°C)	Nº amostras	Limite aceitável pela legislação vigente (BRASIL, 2001)
Até 5,0 x 10 ³	-	
>5,0 x 10 ³ a 1,0 x 10 ⁶	01	Até 5,0 x 10 ³ NMP/g
> 10 ⁶ a 10 ⁸	07	
> 10 ⁸	13	

Fonte: Própria autora.

Portaria n.º 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o limite máximo considerado aceitável de coliformes totais em queijo de muito alta umidade é de 10⁵ NMP/g (BRASIL, 1996) e sua contagem elevada indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto.

No presente estudo, 100% das amostras apresentaram CT fora dos padrões estabelecidos no regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos (BRASIL, 1996), com a contagem variando entre 9,3 x 10⁵ e 1,1 x 10¹⁰ NMP/g, média e desvio padrão 1,1 (±2,3) x 10⁹ NMP/g.

Barreto De Deus et al. (2017) relataram altas contagens de CT em queijos comercializados informalmente nas praias do estado da Bahia, atribuindo os altos níveis de microrganismos deteriorantes e patogênicos à inadequados hábitos de higiene e comercialização dos manipuladores. Apolinário, Santos e Lavorato (2014) também observaram que 24 (77,4%) amostras de queijo oriundos dos laticínios na região da Zona da Mata Mineira,

apresentaram valores acima do recomendado para CT. Constatou-se que tanto em queijos inspecionados quanto nos informais existem falhas no processamento, fato observado por Ribeiro Junior et al. (2019) que detectaram altas contagens na média de coliformes totais para ambos tipos do produto

Dias et al. (2016) atribuíram a elevada contaminação ao fato de que o leite utilizado na fabricação de queijos não inspecionados não ser pasteurizado e no industrializado pode ocorrer recontaminação após a pasteurização devido à manipulação ser excessiva e realizada por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene.

Na presente pesquisa, o destaque destes resultados é a elevada média de CT encontrados nas amostras, superiores a 10^8 UFC/g que demonstra principalmente, potencial produção com leite cru, além de graves falhas na produção do queijo, em geral relacionadas a pobres hábitos de higiene, manipulação sem observância de critérios de higiene, má higienização e sanitização de equipamentos e materiais. Os locais de produção que passam por fiscalização e registro no órgão competente visam neutralizar os pontos críticos onde o produto possa sofrer contaminação, muito diferente dos ambientes com produção caseira que não sofrem fiscalização e controle, portanto, mais sujeitos a falhas na produção e pasteurização.

Assim, como na contagem de CT, todas as amostras desta pesquisa apresentaram CTT (45 °C) fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, com a contagem variando entre $4,3 \times 10^5$ e $2,4 \times 10^9$ NMP/g e média e desvio padrão $4,5 (\pm 7,5) \times 10^8$ NMP/g.

Altas contagens de CTT podem indicar contaminação de origem fecal no produto, uma vez que essas bactérias pertencem ao grupo de coliformes termotolerantes que colonizam o intestino de mamíferos e sua detecção pode indicar a presença de outros microrganismos patogênicos de origem entérica. Portanto, eles são usados frequentemente como indicadores de contaminação fecal, direta ou indireta, e do potencial de risco de agentes patogênicos nos alimentos zoonóticos (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Foi observado durante a coleta das amostras que os clientes não se importavam com as condições de venda do produto como armazenamento fora de refrigeração, exposição a insetos e poeira, manuseio simultâneo de dinheiro e do produto pelo vendedor e ausência de pia para higienização das mãos, critérios que não poderiam ser ignorados e que acarretariam um mínimo de segurança do alimento ao consumidor.

Diversos estudos presenciaram CTT em queijos acima do permitido pela legislação (AMORIM et al., 2014; APOLINARIO et al., 2014; DIAS et al., 2016; BARRETO DE DEUS et al., 2017; SOUZA et al., 2017). Provavelmente, este fato é devido a falhas no processamento dos queijos, quer seja por inadequada higienização de materiais e equipamentos, quer seja por

impróprios hábitos de higiene dos manipuladores nas plantas de laticínios. Até mesmo queijos oriundos de estabelecimentos industriais registrados no órgão sanitário competente, não deram a garantia total de que todos os produtos estão de acordo com a legislação (AMORIM et al., 2014; DIAS et. al, 2016), embora ainda apresentaram melhor qualidade microbiológica do que os queijos não inspecionados.

Prates et al. (2017) comprovaram que as amostras de queijo e leite das plantas de laticínios apresentaram dentro da conformidade para coliformes termotolerantes, reafirmando que a pasteurização da matéria prima elimina os possíveis patógenos de origem fecal.

Acredita-se que o resultado encontrado na presente pesquisa corrobora com as ideias expostas por outros pesquisadores quanto a produção de queijo com leite cru, às más condições de higiene tanto na obtenção da matéria prima quanto durante a fabricação e até mesmo pós fabricação, no momento da embalagem e venda do produto.

5.2 *Escherichia coli*

Das 21 amostras analisadas, 17 apresentaram colônias com características para *E. coli* totalizando 476 cepas isoladas. Isso indica contaminação de origem fecal em 80,95% (17/21) das amostras avaliadas.

Da totalidade das amostras, 52,38% (11/21) mostraram-se positivas para o gene *eaeA* classificando-as como EPEC; 52,38% (11/21) para o gene *stx1* e 14,28% (03/21) para o gene *stx2*, caracterizando-as como STEC; 4,76% (01/21) com positividade simultânea para o gene *eaeA* e *stx1*, caracterizando-a como EHEC.

Comparando as amostras com isolamento de *E. coli*, 64,71% (11/17) exibiram o gene *eaeA*, sendo a mesma porcentagem de amostra encontrada para *stx1*, enquanto apenas 17,65% (03/17) apresentaram o gene *stx2*. A tabela 2 demonstra o consolidado dos resultados encontrados.

Ombarak et al. (2016) identificaram no Egito que 74,5% dos isolados de queijos Karish e 21,7% do queijo Ras, produzidos a partir de leite cru, tinham contaminação por *E. coli* com algum gene virulento envolvido com doenças, entretanto as amostras foram negativas para EPEC. Apenas o leite foi positivo para o gene *eaeA* em 0,9%. Os autores justificam a menor porcentagem de *E. coli* no queijo Ras devido este passar por um processo de cura de três a seis meses, enquanto o queijo Karish é produzido e já comercializado, o que acontece também com o queijo Minas Frescal comercializado informalmente nas feiras livres.

Tabela 2: Consolidado dos resultados de PCR para identificação dos genes *eaeA*, *stx1* e *stx2* das estirpes de 476 *E. coli* isoladas de 21 queijos tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

Amostra de queijo	Nº estirpes testadas	<i>eaeA</i> (positivas)	<i>stx1</i> (positivas)	<i>stx2</i> (positivas)
1*	20	1	8	0
2	16	0	9	5
3	0	0	0	0
4	21	1	1	0
5	9	0	2	0
6	16	0	0	0
7	0	0	0	0
8	30	1	2	1
9	23	1	4	0
10	30	3	20	0
11	16	1	3	0
12	25	2	1	0
13	57	14	0	0
14	47	2	3	0
15	21	0	0	4
16	0	0	0	0
17	61	2	7	0
18	40	0	0	0
19	30	0	0	0
20	0	0	0	0
21	14	1	0	0
Total	476	29	60	10

Legenda: * A amostra 01 apresentou um isolado positivo simultaneamente para gene *eaeA* e *stx1*

Fonte: Própria autora.

Ribeiro Junior et al. (2019) obtiveram 111 isolados característicos de *E. coli* das amostras de queijos clandestinos comercializados no Brasil, sendo 1,8% positivos para EPEC e 2,7% para STEC, entretanto, os 03 (três) isolados obtidos de queijos oriundo de locais de produção inspecionados não foram positivos para EPEC e STEC, segundo o autor, devido ao processo de pasteurização pelo qual o produto foi submetido. A positividade para EPEC encontradas nas amostras deste estudo evidencia a prática da não pasteurização do leite antes da produção do queijo Minas Frescal de maneira informal.

O processo de maturação de alguns queijos com a consequente diminuição da atividade de água pode ocasionar a eliminação de patógenos, como Ombarak et al. (2016) sugeriram após detectar 2,25% de positividade de STEC para queijo Karish fresco e enquanto para queijo Ras curado não foi constatado.

De Campos et al. (2018) não detectaram STEC em nenhuma das 147 amostras de queijo de leite cru no Brasil. Creem que os isolados de STEC foram ofuscados pela abundante presença de *E. coli* comensal, e devido ter sido detectada em diversos países, acredita na existência deste do patógenos no Brasil.

Entretanto neste estudo, *E. coli* comensais não obstaram a detecção dos 20,79% (99/476) isolados positivos para STEC (figura 5), reafirmando a necessidade de se testar cada vez mais um grande número de isolados.

Figura 5: Representação de PCR para gene *stx1* de isolados de *E. coli* obtidos a partir de queijo tipo Minas Frescal comercializado em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.



Legenda: 1 Marcador de peso molecular 1kb, 2 a 21 representam amostra testadas, 6, 7 e 16 amostras positiva para *stx1*, 22 controle positivo com 180 pb, poço 23 controle negativo.

Fonte: Própria autora

Zweifel et al. (2010) avaliando 1.502 amostras de queijos elaborados a partir de leite cru encontraram 5,7% das amostras positivas para gene *stx*. Estes autores indicam que a positividade esteja relacionada à contaminação durante a ordenha e ao fato de alguns estipes possuírem características especiais na tolerância à concentração de sal e acidificação que favorecem a sobrevivência deste microrganismo durante a cura, características não avaliadas neste estudo.

Nobili et al., (2016), após a ocorrência de 22 casos de SHU envolvendo infecção por STEC devido ao consumo de produtos lácteos no sul da Itália, avaliaram 32 amostras de queijo

muçarela e leite, constatando que uma amostra de queijo e duas de leite estavam contaminadas com STEC gene *stx2*, sendo as três amostras oriundas de um mesmo local de coleta. Evidenciaram possível falha na produção do queijo, pois ainda que ocorra o aquecimento do produto de 90-595°C por um determinado período de tempo, a massa talvez não tenha atingido a temperatura interior suficiente para eliminar o patógeno.

Conforme relatado na literatura (PATON e PATON, 1998; FARROKH et al., 2013), o gene de virulência *stx2* é o mais importante tipo de *stx*, pois clinicamente demonstrou-se que a probabilidade de desenvolver a SUH durante a infecção é maior quando a STEC produtora de *stx2* está envolvida. Considerando que quase 15% das amostras do presente trabalho apresentaram colônias de *E. coli* positivas para esse gene, é possível que o consumo de queijos Minas Frescal clandestinos pode ser relacionado com graves casos de infecção e complicações em seres humanos.

O número de estirpes testadas (476) em relação ao número de amostras avaliadas (21) foi de fundamental importância para que se detectasse a presença do gene *eaeA* e *stx* em um isolado simultaneamente, caracterizando-a como EHEC, o que corresponde a 4,76% (01/21) das amostras avaliadas. A detecção deste tipo de *E. coli* é de grande gravidade dado a severa doença causada pela EHEC. Em contrapartida, Ribeiro Junior et al. (2019) não detectou essa simultaneidade nos 114 isolados extraídas de 10 amostras de queijos formais e 10 informais, apesar de como neste estudo, também ter detectado a presença de cepas STEC e EPEC, nas amostras clandestinas.

É importante ressaltar que EHEC é reconhecida como um notável agente patogênico de origem alimentar que provoca várias doenças gastrointestinais, tais como diarreia com sangue ou não sanguinolenta, colite hemorrágica (HC) e SHU em humanos (CAPRIOLI; et al., 2005), podendo levar a óbito.

Comparando esta pesquisa com o trabalho de De Campos et al. (2018) que detectaram apenas um isolado (0,68%) positivo para o gene *eaeA* das 147 das amostras testadas, os resultados aqui apresentados são expressivos e podem ser bem maiores se levarmos em consideração que 47,6% (10/21) das amostras apresentaram cepas positivas para *sxt* e para *eaeA* mas não de forma simultânea.

O consumo do queijo Minas frescal por crianças e indivíduos imunocomprometidos pode causar graves quadros de diarreias se considerarmos que esses produtos podem estar contaminados com EHEC. EHEC é transmitida através de uma variedade de alimentos veiculadores, incluindo carne moída, legumes e produtos lácteos (FARROKH et al., 2013), ademais está associada a diarreia em crianças (CROXEN et al., 2013).

Neste ano, segundo a Secretaria Municipal de Saúde de Vila Velha/ES (SEMSA/PMVV, 2019, dados não publicados) informou que houve o primeiro caso de morte por EHEC. Ocorreu em abril de 2019 um surto em uma creche, onde 37 crianças apresentaram diarreia, algumas com sangue, com duas confirmadas para infecção por EHEC e uma destas evoluindo a óbito. A comida foi descartada como meio de transmissão do patógeno, entretanto continua sendo investigada a água utilizada no playground onde possivelmente alguma criança pode ter consumido.

A presença da *E. coli* com a presença de fatores de patogenicidade está focada e diretamente relacionada a produção do queijo com leite cru, pois mesmo que o produto seja elaborado com as mais rigorosas condições de higiene, isso não eliminaria os patógenos, que só acontece com o correto processo de pasteurização.

A comercialização a céu aberto, as más condições de armazenamento, a manipulação do produto pelos comerciantes nas feiras livres podem certamente favorecer a contaminação do queijo, uma vez que o produto possa ter sido feito de forma higiênica, contudo sofrem contaminação na pós-produção.

Além disso, outros fatores como pH, tempo de armazenamento, concentração de sal, características especiais de algumas estirpes podem ser avaliadas para compreender como a presença de EPEC, EHEC e STEC ainda é baixa em alguns estudos em comparado com este.

5.3 *Staphylococcus spp.*

Das 21 amostras analisadas, 18 (85,71%) apresentaram estafilococos coagulase positiva (ECP) fora dos padrões aceitáveis pela legislação (tabela 3).

Tabela 3: Resultados de estafilococos coagulase positiva em 21 amostras de queijo tipo Minas Frescal comercializados em Araguaína, Tocantins, no período de abril a junho de 2019.

ECP UFC/g	Número de amostras	Ponderações
Até 10^3	03	Máximo permitido pela legislação
$>10^3$ a 10^4	01	-
$>10^4$ a 10^6	16	Quantidade capaz de causar intoxicação alimentar
$>10^6$	01	Quantidade capaz de causar intoxicação alimentar

Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos demonstraram ainda que 80,95% (17/21) das amostras avaliadas continham quantidade de ECP suficientes para produzir toxinas capazes de causar intoxicação estafilocócicas, entretanto no período de coleta citado pode ter ocorrido casos de intoxicações alimentares no município, porém sem notificação, uma vez que o diagnóstico nem sempre é feito, ficando os casos subnotificados.

Intoxicações de origem alimentar, tendo a toxina estafilocócica diretamente relacionada, têm sido citada reiteradamente. Johler et al. (2015) investigaram surto envolvendo 10 crianças e 04 funcionários de um internato na Suíça após o consumo de queijo feito com leite cru, identificando contagens de ECP acima de 10^6 e a presença das enterotoxinas EEA e EEB. Os pacientes apresentaram fortes dores abdominais, severo vômito seguido de febre e diarreia.

No Brasil, Carmo et al. (2002) avaliaram amostra de queijo Minas Frescal que foi consumido por 50 pessoas que foram hospitalizadas apresentando diarreia, vômitos, tonturas, calafrios e dores de cabeça. A análise revelou a presença de ECP em quantidades entre $2,4 \times 10^3$ e 2×10^8 UFC/g, e estirpes produtoras de endotoxinas EEA, EEB e EEC, revelando que a produção caseira sem a observância dos requisitos de higiene e a não pasteurização do leite, pode levar ao consumo de queijo que causam graves riscos à saúde da população.

Os consumidores das feiras livres por vezes não levam em consideração a certificação do produto na forma de registro junto ao órgão competente, que garante o consumo de produtos de qualidade higiênico-sanitária, evitando assim o aparecimento de doenças. Foi observado durante as coletas, que nenhum dos queijos tinha registro ou sequer rotulagem com indicação de no mínimo data e local da produção para rastreabilidade em caso de surto.

Barreto De Deus et al. (2017), examinaram 60 amostras de queijo coalho informal vendido de forma ambulante nas praias do Estado da Bahia, comparando ainda os queijos tostados e não tostados. Constataram que as amostras apresentavam altos níveis de *S. aureus*, a saber, de 4,94 log UFC/g nas amostras queijo não tostado e 3,24 log UFC/g em amostras tostados, excedendo o limite padrão (máximo permitido pela RDC 12/2001 é 2,7 log UFC/g), evidenciando que a intensa manipulação do produto sem as devidas práticas de higiene, como o que acredita acontecer com os queijos desta pesquisa, podem causar riscos à saúde dos consumidores.

Assim como neste trabalho, Mehli et al. (2017), detectaram alta positividade de ECP em 69 (45%) amostras de queijo produzidos de forma clandestina. Destes, extraíram 72 isolados identificando dezesseis perfis diferentes de genes de toxinas. Segundo os autores, a alta

diversidade de isolados portadores de genes de enterotoxinas constitui motivo de preocupação a segurança alimentar pela fabricação do produto sem a pasteurização do leite.

Sánchez-Gamboa et al. (2018) avaliaram nas quatro diferentes estações do ano a maturação do queijo Chihuahua, produzido a partir do leite cru e típico do Norte do México. O estudo demonstrou que a contagem de ECP estava presente em altos níveis no início da maturação do queijo, e a partir de 60 dias de maturação no inverno e 90 dias no outono, a contagem de ECP já era indetectável.

Não apenas a redução da atividade de água colabora para a diminuição da contagem de microrganismos patogênicos no leite, mas também a própria microbiota patogênica ativa (BELOTI, 2015).

Bellio et al. (2019) também pesquisou na Europa ECP em queijos elaborados com leite cru e produzidos em fazendas, constatando decréscimo na contagem do microrganismo e da produção de enterotoxinas com o aumento do tempo de maturação, sendo a partir de 10 semanas indetectável, embora segundo Cunha Neto, Silva e Stamford (2002) a atividade de água reduzida ($a_w=0,86$) permite o crescimento de *S. aureus*, que é compatível com a atividade de água dos alimentos.

Assim, o queijo Minas Frescal de muita alta umidade é o ambiente ideal para a multiplicação do ECP mesmo em condições adversas. Segundo Dias et al. (2016), o padrão físico-químico do queijo Minas Frescal variou de pH entre 5,49 e 6,76, enquanto ASAE (2019) descreve que *S. aureus* pode produzir enterotoxinas em ambientes com valores de pH entre 5,2 e 9,0.

Diversas pesquisas demonstraram a presença de ECP acima dos limites permitidos pela legislação brasileira para diversos tipos de queijos. Arruda et al. (2007) encontraram a presença de ECP acima de quantidades permitidas na análise de 42 amostras de queijos Minas Frescal comercializadas em feiras livres na cidade de Goiânia-GO, atribuindo esta contaminação elevada pelo produto ser comercializado em feiras livres, tendo assim, uma maior manipulação facilitando a contaminação. Amorim et al. (2014) encontraram 100 % das amostras de queijo Minas Frescal clandestinos apresentando elevadas contagens de estafilococo coagulase positiva que variaram de $2,5 \times 10^6$ UFC/g a $1,75 \times 10^7$ UFC/g, passíveis de produzirem intoxicação alimentar.

A clara deficiência de instalações físicas notadas nas feiras livres como a ausência da água potável, além da produção de queijo sem tratamento térmico do leite só agrava a possibilidade da contaminação de produto por *Staphylococcus* spp. gerando altas contagens

alimento, uma vez que este patógeno comensal da pele poderia ser reduzido pelo simples hábito de higienização das mãos e a pasteurização da matéria prima.

Altas contaminações por *Staphylococcus* spp. estão relacionadas a problemas de processamento, tais quais: falhas de pasteurização, higienização inadequada de equipamentos, falhas nas boas práticas de manipulação de alimentos pelos manipuladores e temperaturas de estocagem incorretas (FORSYTHE, 2002).

Fica evidente nos resultados desta pesquisa que falhas nas boas práticas de fabricação e, sobretudo a utilização de leite cru para a produção do queijo Minas Frescal podem resultar em alimento que apresentam risco à saúde. Microrganismos entéricos com genes de patogenicidade tornam o alimento impróprio para o consumo, pela probabilidade de causar doenças com possíveis internações médicas, incapacidade temporária e até óbitos.

5.4 *Salmonella* spp.

Do total de 21 amostras avaliadas para *Salmonella* spp., foram 314 isolados sendo que nenhuma foi positiva na PCR. Importante destacar que a *Salmonella* spp. está presente principalmente no intestino de aves e suínos, e a contaminação de produtos prontos para o consumo poderá ocorrer, se no ambiente de produção, existirem fatores e condições que levem ao contato, principalmente, com as fezes destes animais.

Fatores como a alta contagem de CT e CTT favorecem a inibição da microbiota patogênica como a *Salmonella*, devido ao antagonismo bacteriano patogênico, citado anteriormente, seguido da consequente redução do pH do meio e da intensa produção de peróxido (BELOTI, 2015), podem justificar a ausência deste patógeno nas amostras testadas.

Entretanto, Feitosa, Borges e Nassur (2003) pesquisando no queijo tipo coalho e tipo manteiga detectaram que em 9% das amostras de queijo de coalho e em 15% das de queijo de manteiga foram positivas para *Salmonella* spp. Por menor que seja a presença de *Salmonella* spp. o produto torna-se impróprio para o consumo uma vez que a legislação brasileira determina a ausência total do patógeno no alimento, pelo fato que poucos microrganismos são suficientes para causar doença.

Nos Estados Unidos em um estudo do FDA (*Food Drug Administration*) apenas duas de 885 amostras de queijo, produzidos a partir de leite cru, apresentou positividade para *Salmonella* spp. (CORRELL, 2014), por isso um tamanho de amostra maior pode ser mais representativo para estimar sua prevalência e identificar fatores de riscos para esse agente patogênico (TRMČIĆ et al. 2016).

Andretta et al. (2019) não constatou a presença de *Salmonella* spp. em queijo artesanal Serro, produzido com leite cru, na pesquisa de 53 amostras, tampouco Cardoso et al. (2013), no mesmo tipo de queijo, nas 100 amostras analisadas. Melgaço et al. (2018) avaliaram *Salmonella* nas 90 amostras de queijo, sendo 30 Minas Frescal (fresco) e 60 de queijo Serro (curado) não sendo encontrada nenhuma amostra positiva.

Apolinário, Santos e Lavorato (2014) avaliando amostras de queijo tipo Minas Frescal formais (inspeção federal, estadual e municipal) em Minas Gerais não encontraram positividade em nenhuma das 31 amostras avaliadas. Os dados desse último coincidem com o trabalho de Tavares et al. (2019) que também não detectou a presença de *Salmonella* spp. em 30 amostras de queijo clandestinos produzidos no Rio Grande do Sul.

Quanto a presença de *Salmonella* spp. na superfície das mãos dos manipuladores, leite cru, leite pasteurizado e o queijos de alta umidade, Prates et al. (2017) avaliaram a presença em três plantas de produção com inspeção, constatando ausência de *Salmonella* spp. no queijo, no leite pasteurizado e nas mãos dos manipuladores, mas a presença em uma amostra das seis pesquisadas de leite cru, confirmando a pasteurização do leite ser fundamental para a produção de queijo com qualidade sanitária e sem esse risco microbiológico.

Mesmo que os resultados sugeriram que a prevalência deste patógeno no queijo seja baixa, surtos envolvendo *Salmonella* no queijo podem ocorrer, fato que não pode ser negligenciado (KOSTA et al., 2010; TRMČIĆ et al. 2016).

5.4 *Listeria* spp.

Das 21 amostras analisadas foram testadas 377 isolados e nenhum se mostrou positiva para *Listeria* spp.

O estudo de Dailey et al. (2014) também não identificou a presença de *L. monocytogenes* diversas amostras de produtos alimentícios, inclusive o queijo, atribuindo a intensa presença de bactérias mesófilas aeróbicas, coliformes e *Staphylococcus* como obstáculo ao crescimento de *Listeria* spp.

Melgaço et al. (2018) também detectaram 5,5% das amostras de queijo positivas para *Listeria* spp, sendo quatro de queijo fresco e uma de queijo curado, conferindo a positividade da ocorrência pelo queijo frescal possuir baixo pH (4.9–5.3), alta atividade de água e umidade o que favorecem a sobrevivência do patógeno.

A ocorrência de *L. monocytogenes* é um grave problema de saúde pública com nebulosa compreensão sobre sua baixa prevalência nos queijos. Apesar de confirmado a presença de

enteropatógenos como *E. coli* no presente estudo como indicador de contaminação fecal, as altas contagens de CT e CTT podem explicar ausência de *L. monocytogenes* que pode estar presente no intestino dos animais, mas não foi detectada. A intensa população microbiana resulta na disputa por nutrientes, estresse oxidativo e redução do pH causando dificuldade de reprodução e consequente morte bacteriana.

Uma efetiva implementação de programas de controle de qualidade pode auxiliar em oferta de produtos prontos seguros à saúde dos consumidores (AMSON et al., 2006; FAI et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a presença de patógenos em queijos tipo Minas Frescal clandestino que podem causar graves problemas de saúde, inclusive relacionados com óbitos em indivíduos imunocomprometidos.

A alta contagem de coliformes totais e termotolerantes evidenciadas nas amostras demonstram condição sanitária insatisfatória na produção, armazenamento e/ou comercialização deste alimento. A presença de *E. coli* EPEC, STEC e EHEC e estafilococos coagulase positiva em concentrações que há a produção de enterotoxina, evidencia o iminente risco à saúde pelo consumo do queijo Minas Frescal clandestino.

Além disso, políticas públicas devem ser implementadas, a fim de capacitar produtores sobre as boas práticas de fabricação, as tecnologias para produzir queijos a partir de leite pasteurizado e de forma higiênica, a desburocratização de registro de produtos produzidos pela agricultura familiar para que o produto alcance a mesa do consumidor com qualidade e segurança.

Órgãos de fiscalização sanitária a nível estadual e municipal devem executar programas de capacitação junto aos produtores e comerciantes na produção e venda, respectivamente, bem como ações voltadas aos consumidores para adquirirem apenas produtos registrados e comercializados em condições adequadas de higiene e armazenamento.

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, A. ; YEMMIREDDY, V. ; COSTELLO, M. ; GRAY, P. ; SALVADALENA, R.; RASCO, B. ; KILLINGER, K. Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese **Int. Journ. of Food Microb**, Dec 2, 2018, Vol.286, p.148.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. **Rev. Hig. Alim**, 17(11), p.79-85. 2003.

AMORIM, A. L. B. C.; COUTO E.P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M.A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Rev. do Inst. Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2014.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON. M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAS) NO ESTADO DO PARANÁ – BRASIL, NO PERÍODO DE 1978 A 2000 **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

ANDRETTA, M.; ALMEIDA, T. T.; FERREIRA, L. R.; CARVALHO, A. F.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Jour. Dairy Scie**. 2019.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, nov/dez, 2014.

ARGUDÍN, M.A; MENDOZA, M.C; RODICIO, M.R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins** 2:1751–1773.

ARRUDA, M. L. T. et al. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijos tipos Frescal e Padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia – GO. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 292- 298, 2007.

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2019. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx> Acesso em 01/11/2019.

BARCELOS, A. S. **Avaliação macroscópica, histopatológica e bacteriológica de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate pela inspeção sanitária**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 83 f. 2005.

BARRETO DE DEUS, T.; BARROS, L. S. S.; MENDES DA SILVA, R.; KARINE DA SILVA LIMA, W.; LIMA, V.; DOS SANTOS SILVA, A. (2017). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Curd Cheese Sold in the Northeastern Region of South America. **Intern. Journ. Microb**, 2017.

BELESSI, C. E. A.; GOUNADAKI, A. S.; PSOMAS, A. N. E.; SKANDAMIS, P. N. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **Intern. Jour. Food Microb.**, 145, S46–S52. 2011.

BELLIO, A.; BIANCHI, D. M.; VITALE, N.; VERNETTI, L.; GALLINA S.; DECASTELLI, L. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Fontina Protected Designation of Origin cheese. **Jour. Dairy Sci.** Vol. 101 No. 6, 2018.

BELLIO, A.; CHIESA, F.; GALLINA, S.; BIANCHI, D. M.; MACORI, G.; BOSSI, D.; NIA, Y.; MUTEL, I.; MESSIO, S.; HENNEKINNE, J.A.; DECASTELLI, L. Insight Into the Distribution of Staphylococci and Their Enterotoxins in Cheeses Under Natural Conditions **Front. Microb**, Jan 7, 2019.

BELOTI, V. **Leite: Obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 417 p. 2015.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009.

BIELASZEWSKA, M.; MELLMANN, A.; ZHANG, W.; KOCK, R.; FRUTH A, ET AL. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **Lancet Infect Dis** 11: 671–676.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciên Rural**, 38(5), 1431-1438. 2008.

BRASIL, Portaria nº 146/96 do Ministério da Agricultura e do abastecimento. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. 1996. Acesso em 10. Nov. 2019.

_____, Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do abastecimento. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. 1997. Acesso em 10. Nov. 2019.

_____, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/SUS), 2018. Disponível em <http://portalsinan.saude.gov.br/surto-doencas-transmitidas-por-alimentos-dta> Acesso em: 10 ago. 2018.

_____. _____. _____. _____. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), 2018. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/qgbr.def> Acesso em: 10 ago. 2018.

_____. _____. _____. _____. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella* / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.: il. – (Série A. Normas e manuais técnicos).

_____. _____. _____. _____. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: **Edit. Min. Saúde**, 2010.

_____. _____. Disponível em <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em 24 fev 2020.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2001.

_____. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Brasília, DF. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção1, p. 3977.

BRENNER, D. J.; FARMER III, J. J. Family I. *Enterobacteriaceae* In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R.; STALEY, J. T. (eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd Ed. Volume 2. Ney York: Springer Science Business Media Inc. p. 587-607. 2005.

BUBERT, A.; KOHLER, S.; GOEBEL, W. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:2625–2632.

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; PERESI, J.T.M.; ALVES, E.C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (StEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Bol Epidemiol Paul.** 2013;10(110):4-20.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In.: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.215-228.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H. ET AL. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.** 2005; 36:289-311.

CARDOSO, V. M.; DIAS, R. S.; SOARES, B. M.; CLEMENTINO, L. A.; ARAÚJO, C. P.; ROSA, C. A. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Braz Journ of Microb**, 44(3), 743-749. 2013.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J. ; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E. ; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, Irineide Teixeira. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84p: il.

CHEN, Y.; KNABEL, S. J. (2007). Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 73(19), 6299-6304.

CORRELL, W. A. 2014. Letter to American Cheese Society (ACS) with an Update on What Has Been Done with Respect to Non-toxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*) in Raw Milk Cheese. Public Health Service, **Food and Drug Admin**, College Park, MD

COSTA, F, N.; LIMA., R.M.S; RABELO, R.N. Comportamento frente a ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isolados de derivados lácteos. **Hig. Alimen.**, v.6, n92/93, p 80-83, jan/fev, 2002.

COSTA, G. M. D.; PEREIRA, U. D. P.; CUSTÓDIO, D. A. D. C.; SILVA, N. D. (2011). Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Rev Instit Adolfo Lutz**, 70(4), 584-588.

CROXEN, M.; LAW, R.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microb Reviews**, Washington, v. 26, n. 4, p. 823-880, 2013.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr. Araraquara** v.19, n.2, p. 195-206, abr./jun. 2008.

CUNHA NETO, A. D.; SILVA, C. G. M. D.; STAMFORD, T. L. M. (2002). Enterotoxigenic *Staphylococcus* in nature and processed foods in state of Pernambuco, Brazil. **Food Science and Technology**, 22(3), 263-271.

CUNHA S.A.; CUNHA R. M. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Rev Saúde & Amb.** 2(1): 105-114. 2007.

DAILEY, R. C. et al. The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during the selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using buffered *Listeria* enrichment broth. **Food Microb**, v.44, p.173-179, 2014.

DE CAMPOS, A. C.; PUNO-SARMIENTO, J. J.; MEDEIROS, L. P.; GAZAL, L. E.; MALUTA, R. P.; NAVARRO, A., ... & NAKAZATO, G. Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from cheese made from unpasteurized milk in Brazil. **Foodb Pathog and Disease**, 15(2), 94-100. 2018.

DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Rev Agric Neotrop**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 3, p. 57-64, jul./set. 2016.

ELBAGORY, A.M; EMAN, S.H.; EMAN, K.F. Impact of Probiotic Strains on Growth of Some Food Poisoning Bacteria from Milk and Soft Cheese. **Nutr Food Technol** 1(2): 2015. doi <http://dx.doi.org/10.16966/2470-6086.107>

EMBRAPA. Embrapa Gado de Leite. Anuário do Leite. 2018. Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/36560390/anuario-do-leite-2018-e-lancado-na-agroleite>>Acesso em: 01 set. 2018.

FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A.T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M.S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella sp e Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciêñ Saúde Colet**, 16(2):657-662, 2011.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S., ... & HEGGUM, K. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **Intern.Journ. Food Microb**, 162(2), 190-212. 2013.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria spp.* e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERNANDES, R. V. B.; BOTREL, D. A.; ROCHA, V. V.; SOUZA, V. R.; CAMPOS, F. M.; MENDES, F. Q. Avaliação físico-química, microbiológica e microscópica do queijo artesanal comercializado em Rio Paranaíba-MG. **Rev Inst Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 66, n. 382, p. 21-26, dez. 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 163.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2002

FRIEDRICZEWSKI, A.B.; GANDRA, E.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S. et al. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. **Acta Scien Vet**, 46: 1528. 2018.

HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R. V. (2002) *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol. Infect.** 129: 1-8.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênicosanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 376 p. 1999.

HUNT, M. E. **Microbiological examination**. In: RICE E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.(Ends) Standard Methods for The Examination of Water & Wasterwater, 22thEd. Washington DC; American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2012. Part 9000, Section 9221, p 9.65-9,76.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), **Microg. in Foods 7**. Microbiological Testing in Food Safety Management. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002.

IN LEE, S.H; BARANCELLI, G. V.; DE CAMARGO, T. M.; CORASSIN, C.H.; ROSIM, R. E.; DA CRUZ, A. G.; CAPPATO, L. P.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plant **Food Res Intern**, January, Vol.91, pp.88-91. 2017.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 43, 2016. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados> Acesso em: 14 ago. 2018.

JOHLER, S; WEDER, D ; BRIDY, C ; HUGUENIN, M.C ; ROBERT, L; HUMMERJOHANN, J; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journ Dairy Scien**, May, Vol.98(5), pp.2944-2948. 2015

KLUYTMANS, J.A; WERTHEIM, H.F.; Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. **Infection**. 33:3–8. 2005

KOBAYASHI, P, F.; CARVALHO, A. F.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M. ; PINHEIRO, E.. S. Detecção de *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite cru e queijo de produção informal na Região Metropolitana de São Paulo. **Semina: Ciên Agr**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, jul./ago. 2017.

KONEMAN, E.W.; ALLEN S.D.; JANDA, W.D.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5^a ed. rio de Janeiro: MeDsi; 2001.

KORNACKI, J.L; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: SALFINGER, Y & TORTORELLO, M. L. (eds) **Competition of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 5th ed. American Public Health Association, Washington D.C. Chapter 9, pp 103-120. 2015.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Contr**. 21:805–815. 2010.

KUMAGAI, Y.; GILMOUR, S.; OTA, E.; MOMOSE, Y.; ONISHI, T.; BILANO, F., ... & SHIBUYA, K. Estimating the burden of foodborne diseases in Japan. **Bulletin of the World Health Organiz**, 93, 540-549. 2015.

L'ABE' E-LUND T. M.; JØRGENSEN H. J.; O'SULLIVAN, K.; BOHLIN, J.; LIGARD, G.; GRANUM, P. E.; LINDBACK, T. The Highly Virulent 2006 Norwegian EHEC O103:H25 Outbreak Strain Is Related to the 2011 German O104:H4 Outbreak Strain **PLoS ONE**, 2012, Vol.7(3), p.e31413.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** 2:63–76.

LI, S.; ZHOU, Y.; MIAO, Z. Prevalence and Antibiotic Resistance of Non-typhoidal *Salmonella* Isolated from Raw Chicken Carcasses of Commercial Broilers and Spent Hens in Tai'an, China. **Frontiers in Microbiology**. Vol. 8: 2106. October, 2017.

LEITE, B. M. **Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

LOPES, M.A.; CARMO, E.A.; LIMA, A.L.R.; CARVALHO, F.M.. Análise de rentabilidade de uma empresa com opção de comercialização de queijo ou leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [online]. vol.58, n.4. pp.642-647. 2006.

MACHADO, R.A.M.; RADHAHRISHNA, R.; CUTTER, C.N. Food safety of farmstead cheese processors in Pennsylvania: an initial needs assessment. **Food Prot. Trends** 37, 88–98. 2017.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA, A. JR. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: A Review. **Journal Pharm. Pharmaceutic. Sci.** v. 10, p. 388-404, 2007.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Appl Environ. Microbiol.**, 69: 290-296. 2003.

MARQUES, M. S.; COELHO JUNIOR, L. B.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” processado no estado de Goiás. In: Congresso latino-americano 7.; brasileiro de higienistas de alimentos, 2., 2005, Búzios. **Anais..** Búzios, 2005.

McLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.9, n.3, p.210-213, Mar. 1990.

McLAUCHLIN, J.; REES, C.E.D. Genus I Listeria Pirie 1940. In: DeVOS, P. GARRITY, G.M., JONES, D. et al (eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: 2^aed. Volume 3, New York: Springer, pp. 244-257. 2009.

MEDEIROS, M. I. M.; FILHO, A. N.; SOUZA, V.; MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; CANALEJO, L. M. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.14, n.1, p. 98-105, jan./mar. 2013.

MEHLI, L.; HOEL, S.; BJØRGE, G.M.; NORDENG, A.; KARLSEN, H. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **Intern Dairy Journ**; 65:20-27. 2017.

MELGAÇO, F. G.; LUZ, I. S.; ASSIS, M. R. S.; CALDAS, M. S.; MARANHÃO, A. G.; SILVA, D. A. F., ... & MIAGOSTOVICH, M. P. Assessment of viral and bacterial contamination of fresh and ripened semi-hard cheeses. **FEMS Microbiology Letters**, 365(20), fny225. 2018.

MISZCZYCHA, S. D; THÉVENOT, J.; DENIS, S.; CALLON, C.; LIVRELLI, V.; ALRIC, M.; MONTEL, M.C.; BLANQUET-DIOT, S.; THEVENOT-SERGEANT, D. Survival of *Escherichia coli* O26:H11 exceeds that of *Escherichia coli* O157:H7 as assessed by simulated human digestion of contaminated raw milk cheeses **Intern Journ Food Microb**, 17 February, Vol.172, pp.40-48. 2014.

MONTEIRO, F. C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em abatedouro-frigorífico de suínos da região dos Campos Gerais-PR. **Rev GEINTEC-Gest Inov Tecn**, v. 4, n. 5, p. 1583-1593, 2014.

MORAES, P.M.; VICOSA, G.N.; YAMAZI, A.K.; ORTOLANI, M.B.; NERO, L.A. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathog Disease**. 6:245–249. 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 888p, 2014.
NALÉRIO, É. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M.T.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Food Science and Technology**, 29(3), 626-630. 2009.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.** Jan; 11(1): 142-201. 1998.

NOBILI, G ; FRANCONIERI, I ; BASANISI, M.G ; LA BELLA, G ; TOZZOLI, R ; CAPRIOLI, A ; LA SALANDRA, G. *Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy* **Journal of Dairy Science**, October, Vol.99(10), pp.7877-7880. 2016.

OH, K.H.; JUNG, S.M.; SHIN, E.; CHUNG, G. T.; SEONG, W.K.; CHO, S.H. Comparison of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 and EHEC Non-O157 Isolates from Patients with Diarrhea in Korea **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 2017.

OKURA, M. H. **Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal comercializados na região do triângulo mineiro.** 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, São Paulo.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA.** Porto Alegre. Vol. 30, n. 3 (Jul./set. 2010), p. 279-285.

OMBARAK, R. A.; HINENOYA, A.; AWASTHI, S. P.; IGUCHI, A.; SHIMA, A.; ELBAGORY, A. R. M.; YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **Intern Journ Food Microb**, 221, 69-76. 2016.

OSAILI, T. M.; AL-NABULSI, A. A.; OLAIMAT, A. N.; SHAKER, R. R.; TAHA, M. ; HOLLEY, RICHARD A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during Manufacture and Storage of White Brined Cheese **Journ Food Scien**, September, Vol.79(9), pp.M1750-M1755. 2014.

PARUSSOLO, L.; SFACIOTTE, R.A.P.; DALMINA, K.A.; MELO, F.D.; DA COSTA, U. M.; FERRAZ, S.M. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Cien Agr**, Vol.40(1), pp.163-178. 2019.

PASSOS, A. D. et al. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Ver Inst Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 48-54, 2009.

PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157. **Journ Clin Microb**, 36(2): 598-602, 1998.

PENG, S.; HOFFMANN, W.; BOCKELMANN, W.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R.; HAMMER, P. Fate of Shiga toxin-producing and generic *Escherichia coli* during production and ripening of semi hard raw milk cheese **Journ. Dairy Scien**, February, Vol.96(2), pp.815-823. 2012.

PEREIRA, M.L.; GASTELO, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo Minas **Arq. Bras. Med. Zootec.** v.51, n.5, Belo Horizonte, p.421-426, out., 1999.

PINCHUK, I.; BESWICK, E.; REYES, V. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, Vol.2(8), pp.2177-2197. 2010.

POPOFF, M. Y.; Le MINOR, L. E. Genus XXXIII *Salmonella*. In: BRENNER, .D.J., KRIEG, N.R.; STALEY, J. T. (eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd Ed. Volume 2. Ney York: Springer Science Business Media Inc. p. 764-799. 2005.

PRATES, D. D. F., WÜRFEL, S. R., GOLDBECK, J. C., LIMA, A. S. D., LOPES, G. V., & SILVA, W. P. D. Microbiological quality and safety assessment in the production of moderate and high humidity cheeses. **Ciência Rural**, 47(11). 2017.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1^a ed. Porto Alegre: editora Artmed 512p, 2005.

RASKO, D.A.; WEBSTER, D.R.; SAHL, J.W.; BASHIR, A.; BOISEN, N.et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. **N Engl J Med** 365: 709–717. 2011.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; SILVA, F. F.; LIMA, J. B. A.; OSSUGUI, E. H.; TEIDER JUNIOR, P. I.; CAMPOS, A. C. L. P.; NAVARRO, A.; TAMANINI R.; RIBEIRO, J.; ALFIERI, A. A.; BELOTI V. Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil **Journ Dairy Scien** Vol. 102 No. 12, 2019.
RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI R.; SOARES, B. F.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA, F. G.; SILVA, F. F.; AUGUSTO, N. A.; BELOTI, V. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v. 37, n. 5, p. 3069-3078, set./out. 2016.

RIOS, E.A; SANTOS, J.; GARCÍA-MENIÑO, I.; FLAMENT-SIMON, S. C; BLANCO, J.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J. M. Characterization, antimicrobial resistance and diversity of atypical EPEC and STEC isolated from cow's milk, cheese and dairy cattle farm environments. **LWT**, July, Vol.108, pp.319-325. 2019.

ROCHA, S.L.S. **Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex-PCR**. Dissertação de Mestrado. 68 f. Universidade do Rio Grande do Sul. 2008.

SALVADOR, F. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Rev Fapciências**, Apucarana-PR, v.9, n. 5, p. 30 - 41, 2012.

SÁNCHEZ-GAMBOA, C.; HICKS-PÉREZ, L.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; HEREDIA, N.; GARCÍA, S.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. Microbiological changes during ripening of Chihuahua cheese manufactured with raw milk and its seasonal variations. **Foods**, 7(9), 153. 2018.

SATO'O, Y.; OMOE, K.; NAITO, I. ET AL. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. **J Clin Microbiol.**;52(7):2637–2640. 2014. doi:10.1128/JCM.00661-14.

SCHLEIFER, K.; BELL, J.A. Genus I *Staphylococcus* Rosenbach 1884. In: DeVOS, P. GARRITY, G. M. JONES, D. et al (eds). **Bergey's Manual of Syst Bact**. 2ª edition, Vol. 3. New York, Springer. Pp 392-421. 2009.

SEMSA/PMVV. Secretaria Municipal de Saúde de Vila Velha/ES. Investigação do Surto de Doença Diarreica Aguda ocorrido no município de Vila Velha/2019. Acesso em 01 nov. 2019. Em:
[https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Noticias/Investiga%C3%A7%C3%A3o%20do%20Surto%20de%20Diarreia%20em%20VV%20vers%C3%A3o%20FINAL%20\(Sem%20v%C3%ADdeo\)%20Revisado%20por%20Rodrigo%20Lacen-SESA.pdf](https://saude.es.gov.br/Media/sesa/Noticias/Investiga%C3%A7%C3%A3o%20do%20Surto%20de%20Diarreia%20em%20VV%20vers%C3%A3o%20FINAL%20(Sem%20v%C3%ADdeo)%20Revisado%20por%20Rodrigo%20Lacen-SESA.pdf)

SHANMUGASAMY, M.; VELAYUTHAM, T.; RAJESWAR, J. *InvA* gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. **Vet World**, 4(12):562-564, 2011.

SHARMA, A.; SHIVAPRASAD D.P.; CHAUHAN,K.; KUMRA, N. TANEJA. Control of *E. coli* growth and survival in Indian soft cheese (paneer) using multiple hurdles: Phytochemicals, temperature and vacuum. **Food Sci Techn.** 114. 2019.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. D.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. D. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. D. *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Cien Saude Colet**, 13(5), 1675-1683. 2008.

SILVA, J.A.; SILVA, D. *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Echerichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.** v.34, n.3, p.175-196, set/dez, 2005.

SILVA, N. B. N.; CHAVES, K. F; GRAVINA, C. S; MENDES, A. C. G; MARTINS, A; D. O.; MARTINS, M. L. Avaliação microbiológica de ambientes de diferentes laticínios da Região De Rio Pomba-MG. **Rev Inst de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 66, n. 380, p. 11-15, dez. 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R.A.R; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água (livro eletrônico)**, 5. Ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SOUZA, C. D. O., MELO, T. R. B., MELO, C. D. S. B., MENEZES, Ê. M., CARVALHO, A. C. D., & MONTEIRO, L. C. R. (2016). *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarréiagênica versátil. **Rev Pan-Amaz Saúde.** 7(2), 79-91.

SOUZA, I. A.; GIOVANNETTI, A. C. S.; SANTOS, L. G. F.; GANDRA, S. O. S.; MARTINS, M. L.; RAMOS, A. L. S. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado na zona da mata mineira. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 3, p. 152-162, jul/set, 2017.

TAKAHASHI, H., KURAMOTO, S., MIYA, S., E KIMURA, B. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. **Food Control**, 22, 633–637. 2011.

TAVARES, A.B.; CAVALCANTE, E.A. N.L. D.; TIMM, C. D.; LIMA, H. G.; CERESER, N. D. Queijo artesanal produzido no sul do rio grande do sul: avaliação físico-química, microbiológica e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus coagulase* positiva **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.20, 1-10, e-47184, 2019.

TRMČIĆ, A.; CHAUHAN, K.; KENT, D. J.; RALYEA, R. D.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J., & WIEDMANN, M. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journ Dairy Scien**, 99(8), 6105-6120. 2016.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.3, p.584-640, July 2001.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BAVAI, C.; RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Appl. Microb.** 39, 490–494. 2004.

VIDAL, A. M. C. Obtenção e processamento do leite e derivados. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 220 p. 2018.

WATANABE, S.; ITO, T.; TAKEUCHI, F.; ENDO, M.; OKUNO, E.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of ten serotypes of staphylo coagulases in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** 187 (11): 3698–707. 2005.

WHO, World Health Organization 2019. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/areaswork/foodborne-diseases/ecoli/en/> acesso em Acesso em 01/11/2019a

WHO, World Health Organization. 2019. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) Acesso em 01 nov. 2019b.

ZWEIFEL, C.; GIEZENDANNER, N.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; BEUTIN, L.; DANUSER, J.; STEPHAN, R. Characteristics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. **J. Food Prot.** 73:88–91. 2010.