

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

CRISTINA BERGMAN ZAFFARI GRECELLE

**AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp.
NO PROCESSAMENTO DO QUEIJO COLONIAL PRODUZIDO EM DUAS
AGROINDÚSTRIAS FAMILIARES DO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL.**

Porto Alegre

2018

CRISTINA BERGMAN ZAFFARI GRECELLE

**AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITARIA E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp.
NO PROCESSAMENTO DO QUEIJO COLONIAL PRODUZIDO EM DUAS
AGROINDÚSTRIAS FAMILIARES DO
RIO GRANDE DO SUL - BRASIL.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa da Costa.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Grecelle, Cristina Bergman Zaffari

Avaliação higiênico-sanitária e identificação de *Staphylococcus* sp. no processamento do queijo colonial produzido em duas agroindústrias familiares do Rio Grande do Sul - Brasil. / Cristina Bergman Zaffari Grecelle. -- 2018.

109 f.

Orientadora: Marisa da Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Queijo colonial. 2. Agroindústria familiar. 3. Boas Práticas de Fabricação. 4. MALDI-TOF. 5. Enterotoxinas . I. da Costa, Marisa, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos João Francisco e José Pedro, pelo amor incondicional.

Ao meu marido Roberto, por ser a pessoa que mais acredita em mim e por tudo que temos vivido juntos.

Aos meus “anjos” Ricardo Grecelle e Rafaela Melz Grecelle (*in memoriam*), vocês sempre estarão presentes nos nossos corações.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos.

A minha amiga Jozi Mello, companheira fiel. Jamais vou conseguir retribuir o que você fez por mim. Mil vezes, obrigada.

A colega Raísa Nunes, por dividir comigo um pouco, da sua inteligência.

A equipe do Laboratório de Microbiologia da ULBRA que tornaram possível este trabalho: Jane Mendez, Ana Paula Lino, Letícia da Silva e Carine Viana.

A equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular da ULBRA: Professor Vagner Lunge e Andrea Mascitti, por toda a dedicação e preciosismo.

A professora Marisa da Costa minha orientadora. Agradeço por ter acreditado em mim mais uma vez e pela coragem de enfrentar a batalha.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

AValiação HigIÊNICO-SANITARIA E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp. NO PROCESSAMENTO DO QUEIJO COLONIAL PRODUZIDO EM DUAS AGROINDÚSTRIAS FAMILIARES DO RIO GRANDE DO SUL – BRASIL¹

Autora: Cristina Bergman Zaffari Grecelle

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa da Costa

RESUMO

O queijo colonial representa um produto de importante valor econômico e cultural no cenário da região Sul do Brasil. No entanto suas características intrínsecas o destacam pela sua vulnerabilidade para deteriorações, contaminações e como possível agente causal de doenças de origem alimentar. Este trabalho teve como objetivo o levantamento das condições higiênico-sanitárias através da avaliação das boas práticas de fabricação, análises microbiológicas e identificação de *Staphylococcus* sp. e *E.coli* das principais etapas e superfícies de produção do queijo colonial em duas agroindústrias do RS. Foi aplicada a lista de verificação das BPF e coletadas amostras de leite cru, massa, queijo em maturação e queijo colonial para realização das análises microbiológicas. Em relação às superfícies de produção foram coletadas amostras do tanque e mesa de produção, forma, superfície de maturação e dos manipuladores. Os isolados de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP), *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e *E.coli* foram submetidos a identificação pelo método fenotípico convencional e MALDI-TOF. Genes produtores de toxina estafilocócica (SE) foram pesquisados pela técnica da PCR. Como resultado geral as agroindústrias apresentaram, 47% e 53% dos itens avaliados das BPFs em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação. No queijo colonial, 38% e 25% das amostras coletadas nas agroindústrias A e B, respectivamente, apresentaram valores de coliformes 45°C acima do padrão determinado. A quantificação de SCP ficou dentro do padrão da legislação. Nas agroindústrias analisadas não foram isoladas *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. Foram identificados 72 isolados como *Staphylococcus* sp. onde 43% foram classificados como SCP positiva. Em relação aos isolados de SCN destaca-se o *S.warneri* e *S. sciuri*. Dos 72 isolados de *Staphylococcus* sp. em três *S. aureus* foi detectado genes *sea* e/ou *seb*, em amostra de leite cru e duas de queijo colonial. A presença de SCP, SCN e *E.coli* nas etapas e superfícies de produção indica que houve contaminação pós processamento, tornando-se evidente a necessidade desenvolver estratégias efetivas para minimizar a presença deste e outros microrganismos dentro do ambiente de processamento de queijo colonial como a implantação das BPF.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (109 p.) julho, 2018.

HYGIENIC-SANITARY EVALUATION AND IDENTIFICATION OF *Staphylococcus* sp. IN THE PROCESSING OF THE COLONIAL CHEESE PRODUCED IN TWO FAMILY AGROINDUSTRIES OF RIO GRANDE DO SUL – BRAZIL¹

Author: Cristina Bergman Zaffari Grecelle

Advisor: Prof. Dr. Marisa da Costa

ABSTRACT

The colonial cheese is a product with great economic and cultural value in the southern region of Brazil. Nonetheless, its intrinsic characteristics highlight its vulnerability to deterioration, contamination and as a possible causal agent of foodborne diseases. The objective of this study was to inspect the hygienic and sanitary conditions through the evaluation of good manufacturing practices, microbiological analyzes and identification of *Staphylococcus* sp. and *E.coli* in the main production stages and production lines surfaces of the colonial cheese in two agro-industries of RS. The GMP checklist was applied and samples of raw milk, curd, cheese in ripening and colonial cheese were collected for microbiological analysis. Regarding the production surfaces, samples were collected in the tank and production table, tray, ripening surface and hands workers. The isolates of coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) and *E.coli* were submitted to identification by the conventional phenotypic method and MALDI-TOF and research of genes producers of enterotoxinas by PCR technique. As a general result, the agro-industries presented 47% and 53% of the evaluated items in accordance with the legal established parameters. In the colonial cheese, 38% and 25% of the samples collected in the agroindustries A and B, respectively, presented coliform 45°C above the determined standard. The CPS quantification was within the legislation standard. In the analyzed agro-industries, *L. monocytogenes* and *Salmonella* sp. were not isolated. Seventy-two isolated were identified as *Staphylococcus* sp. where 43% were classified as CPS. In relation to CNS isolates, *S.warneri* and *S. sciuri* are noteworthy. About the 72 isolates of *Staphylococcus* sp. in tree *S. aureus* were detected genes *sea* or/and *seb*, in sample of raw milk and two colonial cheese. The presence of CPS, CNS and *E.coli* in the production stages and surfaces indicates that there was post processing contamination, making evident the need to develop effective strategies to minimize the presence of this and other microorganisms within the colonial cheese processing environment such as GMP implantation.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (109 p.) July, 2018.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Agricultura Familiar e a Produção do Queijo Colonial no RS.....	4
3.2 Queijo.....	5
3.2.1 Queijo Colonial.....	6
3.2.2 Tratamento do Leite para Fabricação de Queijos.....	7
3.2.3 Transformação do Leite em Queijo.....	8
3.2.4 Maturação do Queijo.....	9
3.3 Indicadores Microbiológicos na Produção do Queijo Colonial.....	10
3.3.1 Grupo Coliformes.....	10
3.3.2 Microrganismos Mesófilos Aeróbios.....	12
3.3.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>	12
3.3.4 Fungos.....	14
3.3.5 <i>Listeria Monocytogenes</i>	15
3.3.6 Gênero <i>Salmonella</i>	18
3.4 Requisitos Microbiológicos para Queijos.....	19
3.5 Principais Métodos de Identificação do <i>Staphylococcus</i> sp.	20
3.6 Enterotoxinas Estafilocócicas.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Seleção das Agroindústrias.....	25
4.2 Listas de Verificações.....	25
4.3 Coleta das Amostras.....	27
4.4 Processamentos das Amostras.....	27
4.4.1 Diluição Inicial.....	28
4.4.2 Contagem de Coliformes 30°C, 45°C e Confirmação de <i>e. Coli</i>	29
4.4.3 Contagem de Mesófilos Aeróbios.....	30
4.4.4 Quantificação e Isolamento de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva.....	30
4.4.5 Contagem de Fungos.....	31
4.4.6 Pesquisa de <i>Listeria Monocytogenes</i>	31
4.4.7 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	32
4.5 Identificação dos Isolados pelo Método de Espectrometria de Massa com Fonte de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Analisador de Massas do Tipo Tempo de Vôo.....	32
4.6 Detecção de Genes para Enterotoxinas em <i>Staphylococcus</i> sp.	34
4.6.1 Extração do Dna.....	34
4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase para Detecção dos Genes das Enterotoxinas A, B, C, D E E (<i>Sea, Seb, Sec, Sed, See</i>)	34
4.7 Análises dos Dados.....	35
4.8 Normas de Segurança no Laboratório.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Lista de Verificações.....	38

5.2 Análises Microbiológicas.....	40
5.3 Identificação dos Isolados de <i>Staphylococcus</i> sp.	50
5.4 Amplificação de Fragmentos de Genes Produtores de Enterotoxinas Estafilocócicas (Se).....	53
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58
8. APÊNDICES	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Percentual de adequação obtido na aplicação da lista de verificações das boas práticas de fabricação nas agroindústrias a e b.	38
Figura 2: Produtos da amplificação por pcr para o gene <i>sea</i> em isolados de scp e scn das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do rs.....	54
Figura 3: Produtos da amplificação por pcr para o gene <i>seb</i> em isolados de scp e scn das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do rs.	54
Figura 4: Produtos da amplificação por pcr para o gene <i>sea</i> em isolados de scp e scn das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do rs.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Etapas e análises microbiológicas correspondentes realizadas nas duas agroindústrias produtoras de queijo colonial pesquisadas.....	28
Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores ¹ , temperaturas de anelamento e tamanho de fragmentos esperados para a amplificação de genes de enterotoxinas em <i>staphylococcus</i> sp.....	35
Tabela 3: Classificação dos estabelecimentos utilizada na avaliação das duas agroindústrias após análise da lista de verificação de bpf, conforme o grau de atendimento à rdc n°275.....	36
Tabela 4: Níveis de confiança atribuídos à identificação a partir de uma correlação dos escores dos espectros obtidos do microrganismo de interesse com os do banco de dados do maldi-tof biotyper.....	36
Tabela 5: Número de amostras coletadas de cada etapa de produção, manipuladores e superfícies de produção das agroindústrias produtoras de queijo colonial analisadas.....	41
Tabela 6: Médias e intervalo de valores mínimos e máximos obtidos das análises microbiológicas e temperatura das amostras de leite cru, massa e queijo em maturação das etapas de produção do queijo colonial nas agroindústrias a.....	42
Tabela 7: Médias e intervalo de valores mínimos e máximos obtidos das análises microbiológicas e temperatura das amostras de leite cru, massa e queijo em maturação das etapas de produção do queijo colonial nas agroindústrias b.....	42
Tabela 8: Temperatura obtida durante a coleta e resultados das análises microbiológicas das amostras analisadas do queijo colonial da agroindústria a.....	45
Tabela 9: Temperatura obtida durante a coleta e resultados das análises microbiológicas das amostras analisadas do queijo colonial da agroindústria b.....	46
Tabela 10: Identificação dos isolados de <i>staphylococcus</i> sp. obtidos das amostras coletadas nas etapas de produção do queijo colonial, superfícies de produção e manipuladores da agroindústria a.....	51
Tabela 11: Identificação dos isolados de <i>staphylococcus</i> sp. obtidos das amostras coletadas nas etapas de produção do queijo colonial, superfícies de produção e manipuladores da agroindústria b.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AOAC	“Association of Official Analytical Chemists”
APHA	“American Public Health Association”
ATCC	“American Type Culture Collection”
BAL	Bactéria ácido láctica
BHI	Clado infusão cérebro coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSI	“British Standards”
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FDA	“Food and Drug Administration”
gene <i>sea</i>	Gene da enterotoxina A
gene <i>seb</i>	Gene da enterotoxina B
gene <i>sec</i>	Gene da enterotoxina C
gene <i>sed</i>	Gene da enterotoxina D
gene <i>see</i>	Gene da enterotoxina E
H ₂ S	Ácido sulfídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
ICMSF	“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”
IDF	“International Dairy Federation”
IN	Instrução Normativa
ISO	“International Organization for Standardization”
M	Marcador molecular
MALDI-TOF	“Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization -time-of-flight”
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBPF	Manual de Boas Práticas de Fabricação
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
OIE	Organização Internacional de Epizootias
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol

PPHO	Procedimento padrão de higiene operacional
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SCC	Cassete cromosômicos estafilocócicos
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SE	Enterotoxina estafilocócica
SPE	Exotoxina pirogênica estreptocócica
STEC	<i>E coli</i> Shiga Toxigênica
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico
U	Unidade Internacional
UAT	Ultra alta temperatura
UFC	Unidade formadora de colônia
USDA	“United State Departamento of Agriculture”
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
UVM	“University of Vermont Medium”
VRBA	Agar vermelho violeta bile lactose

1. INTRODUÇÃO

O queijo colonial é um produto de importante valor econômico e cultural no cenário da região Sul do Brasil. Como grande parte da sua produção é de forma artesanal, a tecnologia empregada é constituída, na sua maioria, de conhecimentos adquiridos pela tradição familiar regional, o que dificulta traçar um perfil de padronização específico que permita um conceito geral.

Sua produção é considerada relevante para a agricultura familiar, servindo como alternativa para incremento de renda. Para a sociedade, este produto, também mantém esta importância gerando empregos, diminuindo o êxodo rural, colaborando para sucessão familiar e auxiliando na perpetuação de uma cultura local. Apesar da importância desta atividade, os dados e as legislações específicas ainda são escassos e, conseqüentemente, dificulta sua avaliação e controle.

O processo de produção dos queijos no geral, incluindo o colonial, prevê uma excessiva manipulação sendo este um dos fatores passíveis de contaminação, especialmente microbiana. Estas condições podem ser agravadas quando não há um tratamento térmico adequado do leite e/ou ausência do emprego das boas práticas de fabricação (BPF) ou tecnologia inadequada como a utilização de leite cru para produção do queijo, sem respeitar o tempo mínimo de maturação.

Como conseqüência, elevados índices de estafilococos coagulase positiva e coliformes ocorrem em queijos, tanto no Brasil como em outros países. Por isso, o queijo ocupa lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, veiculando principalmente *Staphylococcus* sp.

A contaminação do queijo por *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positiva e negativa representa um problema de saúde pública pelo risco de causar intoxicação alimentar. Foi comprovada a existência de isolados de *S. aureus* coagulase negativa e de *S. hyicus* com produção variável desta enzima. Fatos que permitem inferir sobre a possibilidade de ocorrência de resultados falsos negativos quando da utilização isolada do teste da coagulase livre para identificação desses patógenos em amostras alimentícias, evidenciando a necessidade de métodos mais eficazes para a identificação desses microrganismos em alimentos.

Na rotina laboratorial, tanto em análises de alimentos quanto em análises

clínicas, o teste de coagulase em tubo é o método padrão empregado para identificar e classificar *Staphylococcus* como coagulase positiva. Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *Staphylococcus aureus* das demais espécies coagulase positivas.

Assim torna-se necessário, além dos métodos clássicos de identificação microbiana, a utilização das técnicas mais sensíveis. Como alternativa, uma das técnicas que tem sido utilizada com elevado grau de sucesso para identificação de uma variedade de espécies bacterianas é a espectrometria de massa pela ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (*Associated Laser Desorption – Ionization – Time of Flight / MALDI-TOF*). O espectro de massas gerado fornece um perfil proteômico do microrganismo pesquisado, tal como uma “impressão digital”. Esses perfis são únicos para cada espécie de microrganismo, sendo possível inclusive distinguir picos específicos para diferenciando entre isolados de uma mesma espécie.

Uma vez que a intoxicação estafilocócicas é causada por enterotoxinas, torna-se relevante, também, a utilização de técnicas moleculares que demonstram se os isolados presentes nas amostras possuem genes para a produção destas enterotoxinas.

Este trabalho teve como objetivo o levantamento das condições higiênico-sanitárias através da avaliação das BPF e análises microbiológicas das etapas de produção do queijo colonial em duas agroindústrias do Rio Grande do Sul. Ainda, foram identificados fenotipicamente e pela técnica de MALDI-TOF microrganismos isolados dos produtos e superfícies das principais etapas de produção. Os isolados de *Staphylococcus* sp. foram avaliados geneticamente quanto à presença de genes para produção das principais enterotoxinas envolvidas em surtos de intoxicação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliação das condições higiênico-sanitárias e identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. em duas agroindústrias familiares, localizadas no Rio Grande do Sul, durante o processamento do queijo colonial.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Levantamento das condições higiênicas da linha de produção de queijo colonial produzido em duas agroindústrias familiares;
- II. Identificação da microbiota contaminante em linha de processamento do queijo colonial;
- III. Identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. presentes nas etapas de produção;
- IV. Identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. presentes nas principais superfícies de produção e manipuladores;
- V. Identificação molecular de genes que codificam para a produção de enterotoxinas nos isolados de *Staphylococcus* sp.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agricultura Familiar e a Produção do Queijo Colonial no RS

A agricultura familiar pode ser definida como um sistema constituído de produtores rurais artesanais e seus familiares. Eles estabelecem relações com o objetivo de produzir alimentos, serviços e lazer, para obtenção de renda e melhoria da qualidade de vida. Terminologias já foram utilizadas para se referir ao indivíduo que trabalha neste sistema como camponês, pequeno produtor, lavrador, agricultor de subsistência e, atualmente, agricultor familiar. Essa troca de termos acompanha a evolução do contexto social e as transformações sofridas pelos agricultores familiares (IBGE, 2006; VINHA et al., 2010; OLALDE, 2017).

Nos registros do Ministério do Desenvolvimento Agrário, a agroindústria familiar representa entre 27 e 30% do produto interno bruto do estado do RS. No Estado, há 173.706 produtores que, de alguma forma, são produtores de leite, sendo que 4,5% têm como destino a comercialização de derivados lácteos de fabricação informal. Do total de produtores de leite, 38% vendem leite cru para indústrias, cooperativas, queijarias ou têm sua agroindústria própria legalizada. Destes, 99% podem ser enquadrados como agricultores familiares (RIO GRANDE DO SUL, 2013; RIES, 2017).

Segundo a base de dados do Programa Estadual de Agroindústria Familiar, coordenado e operacionalizado pela Secretaria de Desenvolvimento Rural, Pesca e Cooperativismo, em 2013 estavam cadastradas 1.439 agroindústrias familiares no RS. Estas agroindústrias podem estar localizadas em qualquer região do Estado. Em torno de 60% do pessoal, que possui sua ocupação exclusivamente em agroindústrias familiares do RS, estão situados nas regiões da Serra, Vale do Taquari, Fronteira Noroeste, Missões, Norte e Médio Alto Uruguai (RIO GRANDE DO SUL, 2013; FEIX et al., 2016).

A produção de queijo colonial artesanal representa um componente econômico importante no auxílio da sustentabilidade das famílias em determinadas regiões do RS. Em especial para os proprietários das agroindústrias, em que parte da renda familiar depende dessa atividade. Entretanto, há necessidade de adequações na infra-estrutura destas agroindústrias com o aprimoramento de tecnologias e

implantação de ferramentas de qualidade, como as BPF, para a obtenção de queijos de acordo com os padrões de qualidade físico-química e microbiológica (VINHA et al., 2010; RIES, 2012; EMATER, 2016).

As agroindústrias que comercializam o queijo colonial trabalham com uma matéria-prima (leite) que apresenta um reduzido período de estocagem, devido ao seu elevado grau de perecibilidade. A opção de retê-la no campo como forma de otimizar a produção industrial torna-se uma alternativa, desde que o produtor disponha de planejamento para proporcionar a segurança dos produtos comercializados. Este tipo de atividade caracteriza o desenvolvimento de uma cadeia curta, que se assenta na conexão direta entre produtores e consumidores, constituindo um mercado emergente enraizado na tradição, origem, natureza ou modo de produção (MIOR, 2014).

3.2 Queijo

De acordo com a definição do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por 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 ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”. A legislação complementa que essa definição, reservando o nome “queijo” exclusivamente para produtos cuja base láctea gordura e/ou proteína sejam de origem animal. No Brasil, o setor lácteo tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos, ocupando o sexto lugar em produção mundial. Da produção anual brasileira de queijo, destacam-se os tipos minas, mussarela, ricota, prato e parmesão (BRASIL, 1996; TESSER et al., 2016).

O queijo artesanal é um produto típico de algumas regiões do Brasil, como em Minas Gerais, Rio Grande do Sul e alguns estados do Nordeste, sendo um meio de subsistência para muitas famílias dessas regiões. Geralmente, o processo de produção é realizado em pequena escala e a receita é passada entre as gerações, com objetivo de manter as características locais do produto. Entre os queijos

artesanais brasileiros, encontramos na região Nordeste, o queijo de coalho, queijo manteiga e requeijão e, em Minas Gerais, os queijos minas (Araxá, Canastra, Salitre, Serro, Campos das Vertentes, Cabacinha). O Rio Grande do Sul é representado, principalmente, pelo queijo serrano, o qual aguarda a indicação geográfica. Essa indicação protege o produto de eventuais falsificações em sua composição, além de garantir a procedência e aumentar sua competitividade em relação a outros produtores. O queijo colonial, também típico deste estado, está em fase de estudos, para futura determinação do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) (TESSER et al., 2016).

A fabricação de queijos envolve alguns procedimentos gerais e outros específicos de cada tipo. O leite utilizado na produção de queijos frescos deve, obrigatoriamente, ser submetido ao tratamento térmico de pasteurização. Para os que passam pelo período de maturação antes do consumo, o leite poderá ser utilizado cru, dependendo do tipo de queijo. A legislação brasileira, porém, exige que queijos produzidos com leite cru sejam comercializados após 60 dias de maturação (BRASIL, 1996).

A Instrução Normativa (IN) N°74 de 16/12/11 do MAPA determina que, quando elaborado a partir de leite cru, o queijo deve ser maturado pelo período determinado pela legislação. Quando, inferior a este, a produção está restrita a queijarias situadas em regiões certificadas (indicação geográfica registrada). Neste caso, a propriedade, deve apresentar status livre de tuberculose, brucelose e controle de mastite. Para isso são necessários pesquisas e estudos específicos realizados por comitês técnico-científicos designados pelo MAPA. Ainda, o leite cru utilizado para a produção deste tipo de queijo deverá ser analisado mensalmente, em laboratório oficial, para composição centesimal, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total. A propriedade também deve estar com o Programa de Boas Práticas de Ordenha e de BPF implantados, incluindo o controle dos operadores e controle de pragas. Por último, a norma indica que a propriedade deve realizar cloração e controle de potabilidade da água utilizada nas atividades (BRASIL, 2011a).

3.2.1 Queijo Colonial

O queijo colonial é um produto próprio da região sul do país produzido a

partir de leite cru ou pasteurizado. Em meados de 1875, esta receita foi trazida por imigrantes italianos e alemães. Esse povo instalou-se na serra gaúcha e no Vale do Taquari, migrando posteriormente para outras regiões e estados. Inicialmente, a sua produção era voltada ao consumo interno e meio de troca, porém com a necessidade de agregar valor à produção de leite e aumentar a renda passou-se a comercializá-lo, mantendo essa atividade até hoje. As características organolépticas desse alimento são dependentes de fatores como estado nutricional do animal, raça, período de lactação, processo de fabricação e condições de maturação (BRASIL, 1996; BRASIL, 2011c; RIES, 2012).

O queijo colonial produzido no sul do Brasil é definido como queijo cuja produção segue métodos tradicionais, com sabor picante e composição variável classificando-se, frequentemente, como de média ou alta umidade, conhecido por massa branda ou macia. Esta característica intrínseca eleva o potencial de deteriorações / contaminações de origem microbiana, podendo causar toxinfecções de origem alimentar (SANTOS-KOELLN et al., 2009; DANTAS et al., 2013; MELO et al., 2013; AMORIM, 2014).

O queijo colonial ainda não possui parâmetros legais de identidade e qualidade, podendo ser fabricado de diversas maneiras, desde que respeite os requisitos microbiológicos previstos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001). Estão sendo realizados estudos para futura obtenção do RTIQ do queijo colonial gaúcho, como já foi realizado com o queijo serrano e queijo minas artesanal. As etapas de produção do queijo colonial não estão bem determinadas, variando conforme a região de produção (MELO et al., 2013; TESSER et al., 2016).

3.2.2 Tratamento do Leite para Fabricação de Queijos

A fabricação de queijo começa com a seleção da matéria-prima, sendo importante a avaliação da composição nutricional e microbiológica além da ausência de resíduos como antimicrobianos. A composição do leite influencia na coagulação enzimática, firmeza da coalhada, sinerese e textura do queijo (FOX et al., 2000; COELHO et al., 2014).

Na produção do queijo colonial, o leite é processado após a ordenha na propriedade rural. Caso não seja utilizado imediatamente, o leite deve ser refrigerado a 4°C e mantido no máximo 48 horas. O tratamento térmico do leite para a fabricação do queijo colonial geralmente é realizado pelo processo de pasteurização lenta (65°C por 30 minutos). O objetivo da pasteurização é a eliminação de bactérias patogênicas e diminuição do número de microrganismos deteriorantes. Esse tratamento térmico modifica a microbiota do queijo, facilitando a fabricação com maior uniformidade. No entanto, pode prejudicar a aptidão do leite para a coagulação, uma vez que insolubiliza parte do cálcio, o que pode aumentar as perdas de sólidos do leite no soro (BRASIL, 2002; PAULA et al., 2009; PEREIRA et al., 2014).

O queijo, quando fabricado com leite pasteurizado, apresenta sabor e aroma menos intensos e matura mais lentamente do que os produzidos com leite cru. Este fato ocorre devido às modificações provocadas pelo calor como inativação de enzimas do leite (lipases e proteases), inativação de grande parte da microbiota endógena e desnaturação de proteínas (RONCATTI, 2016).

3.2.3 Transformação do Leite em Queijo

O queijo tem seu início de produção no momento em que o coalho é adicionado ao leite, com ou sem a adição de cultura de bactérias ácido lácticas (BAL). A função destes microrganismos é auxiliar na coagulação pela diminuição do pH do leite. Isto é alcançado pela conversão da lactose em ácido láctico, sendo o soro posteriormente retirado. A coalhada pode ou não ser prensada e salgada. A coagulação enzimática do leite envolve modificação da micela de caseína pela proteólise provocada pelas enzimas do coalho ou de coagulantes, seguida pela agregação, induzida pelo cálcio. O coalho ou coagulante é adicionado ao leite normalmente a 32-35°C, em quantidade suficiente para haver a coagulação entre 30 e 40 minutos (FOX et al., 2000; RONCATTI, 2016).

A escolha do fermento láctico depende do tipo de queijo a ser produzido, sendo a temperatura de cozimento da coalhada uma importante consideração. No caso do queijo colonial, esta temperatura frequentemente permanece entre 32°C e 35°C e são utilizadas culturas mesófilas tais como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc* sp. Outra importante função do fermento é a

atividade proteolítica que ocorre durante a maturação, contribuindo para o desenvolvimento do sabor e o metabolismo de citrato, necessário para a produção do diacetil, composto aromatizante encontrado em algumas variedades de queijo (FERNANDES, 2009; RIES, 2012).

Quando o ponto final da fabricação no tanque é obtido, a massa é separada do soro e colocada em formas de tamanho e formatos específicos, para que ocorra a drenagem do soro. Esta drenagem resulta em uma massa homogênea que sofrerá, posteriormente, o processo da salga. O teor médio de sal, na maioria dos queijos, varia de 0,5 a 2,5%. O sal promove, pela modificação da pressão osmótica, a sinerese da massa, estimulando a expulsão de soro e, conseqüentemente, a redução da umidade do queijo (COSTA et al., 2004).

3.2.4 Maturação do Queijo

A maturação ou cura consiste em uma série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem em todos os queijos, exceto os que são consumidos frescos. Estes processos alteram a composição química dos queijos, principalmente seu conteúdo em carboidratos, proteínas e lipídeos. O tempo de maturação varia para cada tipo e, neste processo, se desenvolvem as características sensoriais típicas de cada tipo de queijo. A maturação dos queijos, na maioria dos casos, é realizada em câmaras com controle de temperatura e umidade. O tempo varia de acordo com o tipo, podendo ir de poucas semanas a muitos meses ou até anos (MARTINS et al., 2015). No RS, na maioria das indústrias que produzem queijo colonial, a maturação é realizada em câmaras por até 20 dias em temperatura entre 7°C a 14°C (RIES, 2012; GALVANI & AZEVEDO, 2013).

Tradicionalmente, o índice de maturação é medido pela degradação de caseína, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica. Este índice deve aumentar com o avanço da maturação. As enzimas responsáveis pelas transformações são provenientes: do coalho (enzimas proteolíticas); dos microrganismos originalmente presentes no leite; dos microrganismos constituintes da cultura ou fermento láctico adicionado; de outros microrganismos que se desenvolvem no interior ou sobre a superfície do queijo; além das enzimas intrínsecas do leite.

Assim, a maturação do queijo é um lento processo, que envolve uma série de reações microbiológicas, bioquímicas e químicas. Os principais fenômenos bioquímicos que ocorrem durante a maturação dos queijos são a lipólise e a proteólise (FOX et al., 2000).

A microbiota endógena presente no leite cru é mais complexa do que os fermentos industriais adicionados ao leite durante a fabricação dos queijos. Ela desempenha forte influência na lipólise e proteólise, originando compostos responsáveis, também, pelas características de aroma e textura, além de produzirem substâncias capazes de inibir a presença de microrganismos patogênicos (MARTINS et al., 2015; RONCATTI, 2016).

O queijo denominado como “colonial” não possui regulamento técnico de identidade e qualidade pelo MAPA, o que faz com que ainda não se tenha parâmetros definidos a serem seguidos pelos laticínios. Mas pode ser enquadrado como um queijo de média ou alta umidade, de massa semi-dura, de coloração amarelo amanteigada, ligeiramente ácido, com casca fina e amarelada (BRASIL, 1996).

3.3 Indicadores Microbiológicos na Produção do Queijo Colonial

Os indicadores microbiológicos são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes, fornecem dados sobre a ocorrência de deterioração, possível presença de patógenos e contaminação de origem fecal. Sua presença pode auxiliar na análise das condições sanitárias de algumas etapas do processamento, produção ou armazenamento (ICMSF, 2015).

Os principais bioindicadores de contaminação pesquisados no queijo colonial incluem microrganismos do grupo dos coliformes, *Staphylococcus* coagulase positiva e fungos (BRASIL, 2003a; MELO et al., 2013; JAHN et al., 2017). A presença desses microrganismos no alimento pode estar relacionada à má qualidade da matéria-prima e à adoção de técnicas higiênicas inadequadas, que comprometem a qualidade do produto final (DANTAS et al., 2013; COELHO et al., 2014).

3.3.1 Grupo Coliformes

Os coliformes 30°C são compostos por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, apresentam a capacidade de fermentar a lactose, produzindo

ácido e gás a 30°C ou 35°C. Pertencem a este grupo os gêneros *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp. Destes, *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e dos animais. Já *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo (APHA, 2005). Os coliformes 45°C ou termotolerantes correspondem aos coliformes que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 44°C/45,5°C. Eles, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos (FERNANDES, 2009; TONDO et al., 2015; CARRASCOSA et al., 2016).

A *Escherichia coli* tem como características a produção de indol e da enzima β -glicoronidase em 96% das cepas. O metabolismo fermentativo da glicose resulta em uma quantidade significativa de ácidos (ácido láctico, acético e fórmico). Essa característica é evidenciada no teste positivo de vermelho de metila. Conseqüentemente, o teste de Voges Proskauer, que verifica a produção de butilenoglicol como produto final de fermentação da glicose, é negativo para *E. coli*. Outra característica a salientar do metabolismo fermentativo é a capacidade de hidrolizar parte do ácido fórmico produzido, resultando em dióxido de carbono e hidrogênio (produção de gás) (DOYELE & BEUCHAT, 2007).

A *Escherichia coli* é diferenciada sorologicamente em três antígenos: antígenos somáticos (O), polissacarídeo termoestável; antígenos flagelares (H), relacionados com flagelo e antígenos (K), relacionados com polissacarídeos capsulares. Com base no fator de virulência, há seis grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC ou EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (DOYLE & BEUCHAT, 2007).

Entre os métodos microbiológicos utilizados na quantificação de coliformes em alimentos, destaca-se a técnica do o Número Mais Provável que faz uma estimativa do microrganismo (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2010). Outra técnica utilizada, frequentemente, para a quantificação de coliformes é a fermentação de carboidratos em ágar diferencial, como vermelho violeta bile lactose (VRBA). Este

meio de cultura contém o indicador vermelho neutro, propiciando que as colônias dos organismos fermentadores da lactose, como o grupo dos coliformes, fiquem com a coloração vermelho púrpura. Isso os difere de outros organismos gram-negativos resistentes a bile. Podem-se incorporar, ainda, substratos fluorogênicos e cromogênicos, com objetivo de detectar a presença de enzimas específicas com o emprego de substratos apropriados. A adição de tais substratos permite a detecção, enumeração e identificação de maneira direta em placa ou em caldo, reduzindo assim o uso de culturas e testes bioquímicos para designar a identificação de possíveis organismos. Essa técnica permite determinar coliformes 30°C, 45°C presente em amostras de alimentos, usando um único meio de cultura (BRASIL 2003b; SILVA et al., 2006).

3.3.2 Microrganismos Mesófilos Aeróbios

Os microrganismos mesófilos aeróbios auxiliam na avaliação da qualidade sanitária e a adesão das BPF. No entanto, são pobres indicadores de segurança, uma vez que não estão diretamente relacionados à presença de patógenos (APHA, 2005; ICMSF, 2015). Esse grupo é importante, por incluir a maioria dos microrganismos presentes no leite, tanto deterioradores como patogênicos. A contagem de microrganismos mesófilos pode aumentar significativamente quando o leite entra em contato com equipamentos e/ou utensílios de ordenha, ou no próprio tanque de refrigeração, não higienizados corretamente e, principalmente, pela ausência de uma refrigeração adequada (CARRASCOSA et al., 2016).

Para Gleeson et al. (2013), leite considerado de boa qualidade não deve apresentar número total de bactérias viáveis acima de 100.000 UFC/mL (5 log/mL). Já a IN N° 31 permite que o leite cru apresente até 300.000 UFC/mL (5,4 log/mL) (BRASIL, 2018).

3.3.3 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é representado por cocos gram-positivos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, com arranjo isolado, aos pares, em cadeias curtas ou em agregados com forma de cachos. Segundo Euzéby (2018), o gênero é constituído pelas seguintes espécies: *S. agnetis*, *S. argenteus*, *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. capitis*,

S. caprae, *S. carnosus*, *S. caseolyticus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. condiment*, *S. delphini*, *S. devriesei*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. fleurettii*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. lutrae*, *S. massiliensis*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii*, *S. petrasii*, *S. pettenkoferi*, *S. piscifermentans*, *S. pseudintermedius*, *S. pulvereri*, *S. rostri*; *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. schweitzeri*, *S. sciuri*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. stepanovicij*, *S. succinus*, *S. vitulinus*, *S. warneri* e *S. xylosus*.

Raramente apresentam cápsula e suas colônias podem ser brancas, creme, amarela ou laranja. São imóveis, não formam esporos e podem converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela produção da enzima catalase. A maioria das espécies são anaeróbias facultativas. Seu metabolismo pode ser oxidativo e fermentativo. Podem, ainda, metabolizar a glicose tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, sendo a fermentação deste açúcar um importante diferencial desse gênero (SCHLEIFER & BELL, 2009).

Quanto às características metabólicas, *Staphylococcus* sp. podem multiplicar-se sob pressão osmótica alta, são resistentes ao dessecamento e toleram altas concentrações de sal (até 10% NaCl). São mesófilas, têm sua temperatura ótima de multiplicação entre 30°C e 37°C, além de se desenvolverem em faixas de pH entre 4,0 e 9,8 (RUARO et al., 2013; KÜREKCI, 2016).

Espécies do gênero *Staphylococcus* são frequentemente associadas a casos de intoxicação alimentar e as características de produção do queijo colonial oferecem condições para contaminação e sobrevivência deste microrganismo. A intoxicação alimentar causada por este microrganismo está relacionada a capacidade das cepas em produzirem enterotoxinas. As enterotoxinas mantêm sua estabilidade mesmo após tratamento térmico. No caso dos queijos é necessário o controle permanente dos estafilococos nas etapas de produção, incluindo as iniciais. A presença da enterotoxina no leite cru permanecerá após o processo térmico de tratamento (HENNEKINE et al., 2012; KADARIYA et al., 2014).

A capacidade patogênica dos estafilococos é atribuída a uma combinação de propriedades que contribuem para a colonização e permanência da bactéria no hospedeiro e no ambiente. Essas propriedades incluem a capacidade de produção

das hemolisinas, nucleases, proteases, exoproteínas e resistência a antimicrobianos, além da capacidade de formarem biofilme, colaborando para sua permanência em superfícies abióticas (PIETTE & VERSCHRAEGEN, 2009; GALINARI et al., 2014).

O gênero inclui patógenos de humanos e animais, tanto coagulase positiva (SCP) como *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, quanto os coagulase negativa (SCN) como *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, entre outros. *Staphylococcus aureus* é o representante mais estudado do gênero, conhecido mundialmente por estar relacionado com diversas intoxicações e infecções em humanos e animais (ZELL et al., 2008; BLAIOTTA et al., 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica, causada pela ingestão de enterotoxinas, produzidas principalmente por *S. aureus*, é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns no mundo (WANG et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Embora o principal representante, o *S. aureus*, seja coagulase positiva, a capacidade patogênica dos estafilococos não é exclusividade desse grupo. Outras espécies, por não possuírem a capacidade de sintetizar a enzima coagulase, passaram por muito tempo sem importância médica. A distinção fenotípica de coagulase negativa e positiva era suficiente para determinar a conduta clínica, uma vez que se assumia que a patogenicidade dos *Staphylococcus* sp. estava ligada à produção da coagulase. No entanto, com o aumento da significância dos SCN e a quantidade de novas espécies descritas, esta diferenciação tem sido cada vez mais questionada (GILLESPIE et al., 2009; COSTA et al., 2012; MOURA et al., 2012).

3.3.4 Fungos

Um dos principais problemas relacionados à perda de qualidade de queijos se deve à deterioração de origem fúngica. Os fungos filamentosos podem contaminar o leite através dos poluentes do ar ou utensílios, e sua presença pode ser um indicativo da sanitização insatisfatória durante o processamento. Algumas espécies também podem resistir a produtos químicos empregados na sanitização de utensílios e contaminar os produtos quando em contato (MORAIS, 2005; JANH et al., 2017).

A presença de fungos em queijos é, em alguns casos, indesejável. Quanto maiores as contagens desta classe de deteriorantes, maiores são as deficiências de

higiene na planta de processamento. Há, contudo, fungos filamentosos e leveduras que são úteis na fabricação de alguns tipos de queijos. *Penicillium roqueforti* é um fungo fundamental na produção dos queijos azuis, entre eles o mais conhecido é o gorgonzola. Já *P. camemberti* e *P. candidum* são utilizados na produção de queijos tipo camembert (TORKAR et al., 2008; LAVOIE et al., 2012).

Os fungos fazem parte da microbiota saprófita das câmaras de maturação de queijos e, neste ambiente, podem se tornar indesejáveis por provocar alterações sensoriais, desclassificação dos produtos e defeitos, levando a perdas econômicas. O ambiente das câmaras de maturação de queijos favorece a multiplicação fúngica devido às condições de temperatura e umidade. Os esporos dos fungos presentes no ar requerem oxigênio para desenvolvimento, assim, em geral, localizam-se na superfície de queijos expostos ao ar, diminuindo seu desenvolvimento em queijos embalados a vácuo. Os fungos filamentosos podem permanecer em bolsas de ar existentes entre o material de embalagem e a superfície do queijo (PEIXOTO et al., 2012).

Por sua vez, as leveduras são contaminantes ambientais naturais podendo estar presentes em superfícies de produção úmidas, leite e soro. No entanto, a maior fonte de leveduras, é a salmoura. Assim, os queijos salgados em salmouras são os mais susceptíveis à contaminação por leveduras. Além disso, altos teores de sal na superfície do queijo fazem com que haja migração da umidade, criando ambiente favorável às leveduras. As condições de umidade e o ambiente com alto teor de sal da superfície criam condições seletivas para leveduras e fungos filamentosos (COSTA et al., 2004; LAVOIE et al., 2012; PEIXOTO et al., 2012; JAHN et al., 2017).

3.3.5 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bacilo gram-positivo, não esporogênico. É catalase positivo, não produtor de ácido sulfídrico (H₂S), móvel quando incubado abaixo de 30°C e imóvel quando incubada acima dessa temperatura, sendo capaz de multiplicar entre 0 e 42°C. O gênero é constituído por 20 espécies e seis subespécies: *L. aquática*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. costaricensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*,

L. newyorkensis, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* e *L. welshimeri* (EUZEBY, 2018).

A *Listeria monocytogenes* é a espécie comprovadamente transmitida por alimentos ao homem. São bactérias ubíquas estando presente no ambiente. A contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* pode ser ambiental ou a partir da matéria prima contaminada (TODD & NOTERMANS, 2011; CARTWRIGHT et al., 2013).

A listeriose é a doença causada por este microrganismo e, embora represente 0,02% dos casos de doenças transmitidas por alimentos no mundo, é a causa de aproximadamente 28% das mortes resultantes. A multiplicação em temperatura de refrigeração e em ambientes com baixa atividade da água, medidas estas utilizadas como controle da multiplicação da maioria dos patógenos em alimentos, contribuem para a transmissão de *L. monocytogenes* (ALLERBERGERET et al., 2010; CARTWRIGHT et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; OXARAN et al., 2017).

A *Listeria monocytogenes* suporta ciclos repetidos de congelamento e descongelamento e possui, também, a habilidade de multiplicação em ambiente com concentração de até 10% de cloreto de sódio e em uma ampla faixa de pH (4,4 – 9,0). Entre as bactérias não esporulantes, este gênero apresenta uma das maiores resistências térmica (ICMSF, 2015).

A listeriose é a denominação de um grupo de sinais clínicos causadas por *L. monocytogenes* que incluem septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical ou intrauterina, tendo como principais grupos suscetíveis gestantes, imunossuprimidos como idosos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida ou portadores de HIV, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam comprometimento do sistema imunológico (OXARAN et al., 2017).

Os isolados de *L. monocytogenes* podem ser divididos em 14 sorotipos, baseados nos antígenos somáticos e flagelares, e que são identificados empregando-se o esquema alfa-numérico propostos por Seeliger & Höhne (1979). Aproximadamente 95% dos isolados relacionados a infecções humanas pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b. No Brasil, os sorotipos mais frequentemente encontrados são 1/2a e 4b. Os alimentos associados com a transmissão da doença,

na maioria das vezes, são processados industrialmente, têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração e são consumidos sem cocção prévia (HOFER et al., 2006; SILVA et al., 2011).

Os métodos convencionais oficiais para o isolamento de *L. monocytogenes* de alimentos são os descritos pelas seguintes organizações de aceitação internacional: *United States Food and Drug Administration (FDA) method*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC) official method*, *International Organization for Standardization (ISO)* e *United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS)* (ICMSF, 2015). Na sua maioria, estes métodos incluem uma etapa de enriquecimento baseada no uso de meio de cultura contendo agentes seletivos. A partir disto, faz-se o isolamento em meios seletivos sólidos (diferencial) e identificação convencional das colônias por testes bioquímicos e sorológicos (SILVA et al., 2010).

A ISO 11290-1 é o método oficial mais empregado, caracterizando a presença ou ausência do microrganismo na amostra analisada. No estágio de enriquecimento primário, a amostra é incubada em estufa a 30°C por 24 horas em caldo Half Fraser suplementado. Posteriormente, segue-se o enriquecimento secundário a partir do primário e incubação em estufa a 30°C por 24 horas em caldo Fraser suplementado. A confirmação das colônias típicas desenvolve-se por meio da seleção destas, obtidas após semeadura em meio de cultura seletivo.

Os métodos AOAC, FDA e USDA/FSIS da mesma maneira que os métodos ISO englobam estágios de enriquecimento, os métodos AOAC, FDA e USDA/FSIS também os fazem diferenciando os agentes seletivos de enriquecimento e semeadura em meio de cultura diferencial. São empregados, por exemplo, nos métodos USDA o *University of Vermont Medium (UVM)*, o qual apresenta ácido nalidíxico e acriflavina. Já no segundo estágio, o enriquecimento é dado pelo caldo Fraser, contendo ácido nalidíxico, cloreto de lítio, acriflavina ou tampão de ácido morfoalino-propanosulfônico (MOPS-BLEB). As condições de incubação dependem da matriz escolhida nas etapas de enriquecimento. Posteriormente, as culturas são semeadas em ágar MOX que contém cloreto de lítio, colistina e moxalactam. A confirmação será dada por meio de métodos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (SILVA et al., 2010; ICMSF, 2015).

3.3.6 Gênero *Salmonella*.

Salmonella sp. é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos. É um bacilo gram-negativo, a maioria é móvel, com temperatura ótima de crescimento de 38°C, produzem ácido e gás a partir de glicose, são oxidase negativa, catalase positiva, indol e Voges-Proskauer negativa, citrato Simmons, vermelho de metila, lisina e H₂S positivas. A uréia não é hidrolizada. Os humanos e os animais são reservatórios primários de *Salmonella* sp., mas esses microrganismos são abundantes na natureza. Assim podem contaminar produtos frescos, tanto durante a produção, através da água, solo, insetos ou outros animais, que estão contaminados com matéria fecal; quanto durante a preparação, por meio de contaminação cruzada (equipamentos, superfícies e manipuladores de alimentos). Além disso, dependendo da cepa, *Salmonella* pode ser tolerante e resistir a temperaturas baixas ou altas e ambientes ácidos extremos, conseqüentemente, pode não ser eliminada devido a condições inadequadas de armazenamento ou processamento (TONDO et al., 2015; YENI et al., 2016).

As principais espécies pertencentes ao gênero *Salmonella*, segundo Euzéby (2018) são: *S. arizonae*, *S. bongori*, *S. choleraesuis*, *S. entérica*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi*, *S. subterrânea*, *S. typhi*, *S. typhimurium*. As espécies são diferenciáveis pelos seus antígenos de estrutura, antígeno somático (O), flagelar (H) e capsulares (Vi), adotando-se o esquema de Kaufmann-White.

As doenças transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* sp. são, frequentemente, associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite cru ou leite pasteurizado. A *Salmonella* sp. não resiste ao processo de pasteurização, no entanto, quando é encontrada deve-se a um tratamento térmico impróprio ou à contaminação pós-pasteurização (ICMSF, 2015). A salmonelose humana é uma das doenças de origem alimentar bacteriana com maior ocorrência em nível mundial (WADAMORI et al., 2017). A dose infectante típica varia de 10⁶ a 10⁸ UFC/g, porém a quantidade de células de *Salmonella* sp. que é necessária para causar uma infecção depende de fatores, como, o grau de resistência do hospedeiro e o estado fisiológico das células bacterianas. No Brasil e no Rio grande do Sul, *Salmonella* sp. tem sido um dos principais patógenos envolvidos com surtos alimentares, desde a década de noventa (BRASIL, 2017).

Procedimentos padrões para isolamento de *Salmonella* sp. são especificados por órgãos internacionais, como ISO (*International Standards Organization*), APHA (*American Public Health Association*), AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), IDF (*International Dairy Federation*), BSI (*British Standards*) geralmente após realização de estudos colaborativos. Contudo, não existe uma única metodologia que possa ser aplicada para todos os tipos de alimentos. A técnica mais utilizada para detecção de *Salmonella* sp. em alimentos é o método recomendado pela APHA. É um método de cultura clássico dividido em várias etapas que, salvo algumas variações na seleção dos meios e preparo das amostras, pode ser aplicado a qualquer alimento.

3.4 Requisitos Microbiológicos para Queijos

A diversidade dos tipos de queijos, bem como formas de produção, consumo e comercialização levam à ausência de análise padrão. As regulamentações geralmente determinam a quantificação de coliformes 45°C e SCP (ICMSF, 2015). Porém, segundo a Portaria nº146 (BRASIL, 1996) e a RDC nº12 (BRASIL, 2001) os queijos devem ser classificados, primeiramente, quanto ao conteúdo da umidade da massa:

- Queijos de baixa umidade: umidade menor que 36%;
- Queijos de média umidade: umidade entre 36% e 46%;
- Queijos de alta umidade: umidade entre 46% a 55%;
- Queijos de muita alta umidade: umidade superior a 55%.

A legislação ainda prevê padrões microbiológicos para queijo ralado e queijos fundidos ou reelaborados e queijos processados em ultra alta temperatura (UAT).

Os requisitos microbiológicos estabelecidos são elaborados de acordo com critérios e planos de amostragem para aceitação de lotes da Comissão Internacional de Especificações Microbiológica dos Alimentos (ICMSF).

Para análise de coliformes 45°C e SCP em queijos os limites superiores (M) podem variar, no entanto, a população mais alta não deverá ultrapassar 5×10^3 UFC/g ($3,69 \log_{10}$ UFC/g⁻¹) e 10^3 UFC/g ($3 \log_{10}$ UFC/g⁻¹), respectivamente. Para microrganismos reconhecidamente patogênicos, no caso dos queijos *L.*

monocytogenes e a *Samonella* sp., são utilizados sempre o número de amostras de um lote (n) e o valor de aceitação (c) igual a zero. Queijos classificados como muita alta umidade a Portaria nº146 do MAPA determina quantificação de fungos devendo este valor permanecer em até $5 \times 10^3 (3,69 \log_{10} \text{ UFC/g}^{-1})$ (BRASIL, 1996).

3.5 Principais Métodos de Identificação do *Staphylococcus* sp.

Entre as técnicas utilizadas na rotina laboratorial para identificação *Staphylococcus* sp., a caracterização fenotípica apresenta relevância. Esta caracterização, inicialmente, é baseada na morfologia e compreende na visualização microscópica da célula em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados. A identificação começa com a inoculação primária em ágar sangue, sendo as colônias convexas, de coloração variando do branco-porcelana a amarelo podendo apresentar hemólise ou não. Na sequência da identificação, com execução dos testes da catalase, coagulase em lâmina e em tubo é possível identificar o gênero *Staphylococcus* sp. (BRASIL, 2001).

O teste da coagulase em lâmina identifica isolado de *Staphylococcus* que possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante “clumping factor”) na superfície da parede celular, reagindo com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação. O teste da coagulase em tubo baseia-se na presença da coagulase livre que reage com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina. A formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90 graus da vertical (BRASIL, 2003).

Outro teste usualmente utilizado na identificação de *Staphylococcus* é da DNASE. Este teste consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA. Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNase indica a positividade da prova. O teste da endonuclease termoestável é efetuado no mesmo meio de DNA. A leitura do teste é semelhante ao da DNase (BECKER et al., 2014).

Brito et al. (2002), propuseram um esquema simplificado para identificação deste agente, baseado na triagem pela coagulase e utilizando outros quatro testes, produção de acetoína, utilização anaeróbia do manitol, produção de β -galactosidase e a suscetibilidade à acriflavina. Laboratórios de microbiologia clínica têm utilizado sistemas de identificação comercial como API Staph e ID 32 Staph (BioMérieux),

VITEK 2 (BioMerieux), RapID (Remel) e Staph-Zym (Rosco Diagnostica) e sistemas automatizados como BD Phoenix™. Sua utilização pode ser justificada para as espécies estafilocócicas mais frequentemente isoladas, para as quais a precisão de identificação pode chegar a 90%. Porém, frequentemente, esses sistemas oferecem duas ou mais sugestões para identificação de espécies com níveis de precisão similares (BECKER et al., 2014).

Apesar de muito usados na rotina laboratorial, testes fenotípicos nem sempre apresentam dados satisfatórios, principalmente na identificação em nível de espécie. A dependência da expressão de atividades metabólicas ou fatores morfológicos da bactéria é visto como um fator limitante desses testes (ALEXOPOULOU et al., 2006; BECKER et al., 2014).

Outro método que auxilia na identificação é a técnica de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization) e analisador de massas do tipo tempo-de-voo - TOF (Time-of-Flight). Esta técnica permite a comparação do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, possibilitando a classificação e identificação do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (CHERKAOUI et al., 2010; ANGELETTI, 2016).

A espectrometria de massa MALDI-TOF tem sido utilizada com sucesso para a identificação de uma grande variedade de espécies bacterianas. Na análise por MALDI-TOF, cada perfil pode ser automaticamente comparado a uma biblioteca de espectros de referência, gerando a lista dos microrganismos mais estreitamente relacionados. Essa classificação indica o nível de confiança na identificação e, dependendo de quão elevado é o valor, o organismo é identificado no nível de gênero ou espécie (CLARK et al., 2013; PATEL, 2013).

Estudos já foram realizados para avaliar o desempenho de MALDI-TOF na identificação de microrganismos, demonstrando que essa metodologia apresenta uma alta acurácia para uma grande variedade de espécies e que os bancos de dados comercialmente disponíveis Biotyper® (Bruker Daltonics) e SARAMIS® (Shimadzu Corporation) são confiáveis (EIGNER et al., 2009; CHERKAOUI et al., 2010; ANGELETTI, 2016). Esses trabalhos comparam a espectrometria de massa com outras ferramentas já utilizadas na identificação de microrganismos, como os testes

bioquímicos automatizados e os tradicionais de cultivo, e demonstram acurácias entre 98 e 99% para as espécies analisadas. Nagy et al. (2009), trabalhando com espécies de *Bacteroides*, relataram que o poder de discriminação e identificação por MALDI-TOF foi superior aos testes bioquímicos. Eigner et al. (2009), ao analisarem 1116 isolados clínicos comparando MALDI Biotyper com a identificação bioquímica convencional, demonstraram 95,2% de consistência na identificação de espécies bacterianas.

A identificação por meio do perfil protéico da bactéria ao invés de diferenciações físicas, metabólicas ou bioquímicas é uma das principais vantagens do MALDI-TOF (HSIEH et al., 2008; ANGELETTI, 2016). Ao contrário da identificação por meio de métodos bioquímicos convencionais, que são processos demorados e requerem de 24 a 48h após a positividade da cultura, a identificação usando MALDI-TOF pode analisar amostras rapidamente dentro de minutos após a positividade da cultura. O protocolo de extração de proteínas para análise por MALDI-TOF para uma única amostra leva 23 minutos e o tempo de processamento quando feito com várias amostras é reduzido (aproximadamente 3h para 82 amostras), facilitando o resultado e aumentando o rendimento (PANDA et al., 2014).

Com a popularização das técnicas de biologia molecular, a classificação de microrganismos baseada na análise das sequências de ácidos nucleicos tem sido cada vez mais utilizada, sendo consideradas superiores às provas fenotípicas de identificação bacteriana (HWANG et al., 2011). Abordagens como amplificação, hibridização e sequenciamento, podem ser utilizadas para a identificação de estafilococos cultivados. De modo geral, a amplificação de sequências específicas de genes universais, em regiões conservadas, seguida de sequenciamento permite a diferenciação desses organismos em espécie e, até mesmo, subespécie e pode ser considerado o padrão ouro para a identificação de espécies de *Staphylococcus* sp. (BECKER et al., 2014). O seqüenciamento ainda é considerado o método ouro de confirmação de identificação, mas apresenta um custo elevado comparado aos métodos tradicionais.

3.6 Enterotoxinas Estafilocócicas

As enterotoxinas pertencem à família das toxinas pirogênicas, junto com a toxina da síndrome do choque tóxico, as toxinas esfoliativas A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas com propriedades multifuncionais, conhecidas pela capacidade de interagir com células do sistema linfóide, induzindo proliferação e ativação de células reguladoras. Sua capacidade antigênica diz respeito aos seus efeitos no sistema imune, estimulando linfócitos T auxiliares de forma inespecífica e causando a liberação exacerbada de citocinas. A esse evento, segue-se a toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune, podendo originar uma variedade de sintomas como febre, náuseas, vômitos e choque (BALABAN & RASOOLY, 2000).

Argudín et al. (2010) descreveram 22 enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, este universo já era de mais de 40 se fossem contabilizadas suas variantes moleculares *sec1*, *sec2* e *sec3*, *sec* ovina e *sec* bovina; *sed* e *see* e os novos tipos de *se* (*seg*, *seh*, *sei*, *ser*, *ses*, *set*) e *sel* (*selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selu*, *selu2* e *selv*).

Suas propriedades físico-químicas como resistência a altas temperaturas, baixa atividade da água e estabilidade às proteases intestinais e à pepsina, conferem potencial para que permaneçam em alimentos mesmo após a eliminação da célula produtora. Para que a bactéria produza as toxinas, a faixa de temperatura (35 e 40°C) e a atividade de água (0,98) devem ser consideradas. As enterotoxinas são termorresistentes, podendo permanecer em alimentos tratados termicamente. Estudo avaliando a inativação de SEA, SEB e SEC após tratamento térmico em diferentes temperaturas concluiu que pode ocorrer a redução no título das enterotoxinas. No entanto, a quantidade inicial da toxina, e a temperatura influenciam a inativação, existindo diferença também entre enterotoxinas. A temperatura mínima para a produção de toxinas pode variar entre 15 e 38°C (NECIDOVA et al., 2009; HENNEKINNE et al., 2012; PAULIN et al., 2012).

Os genes codificadores das enterotoxinas estão localizados em elementos genéticos acessórios, incluindo plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade de *S. aureus*, ilha genômica, ou ao lado dos elementos de cassetes cromossômicos estafilocócicos. A maioria destes são elementos genéticos móveis e sua disseminação

entre os isolados de *Staphylococcus* sp. pode modificar sua capacidade de causar doença e contribuir para a sua evolução. Assim, embora *S. aureus* seja o principal e mais estudado representante do gênero quanto à presença e expressão de enterotoxinas e dos demais fatores de virulência, há suspeitas de que outros estafilococos possam também carrear esta característica, principalmente com o aumento da significância clínica de algumas cepas de SCNs (ARGUDÍN et al., 2010; MAZZARIOL et al., 2012; ÜNAL & ÇINAR, 2012).

Em relação aos genes codificadores de enterotoxinas, estes estão presentes em muitas cepas isoladas de alimentos, porém nem sempre a expressão da toxina é confirmada (FIJALKOWSKI et al., 2016). Em estudos realizados por Nunes et al. (2015), dos isolados de SCN identificadas em queijo minas frescal a maioria foram capazes de produzir enterotoxinas. No entanto, em estudo realizado por Veras et al. (2008) e Rall et al. (2010) amplificação do gene *sea* não garantiu a expressão da enterotoxina, enquanto para *seb* a expressão ocorreu.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das Agroindústrias

Foram selecionadas duas agroindústrias familiares de duas regiões do RS, denominadas A e B, produtoras de queijo colonial para aplicação das listas de verificações e coletas mensais das amostras. As análises foram realizadas no período entre agosto de 2014 a setembro de 2015. As empresas participaram de forma voluntária e por intermédio de autorização escrita (APÊNDICE I), permitiram as visitas, as análises técnicas e biológicas na Unidade de Fabricação de sua responsabilidade.

A agroindústria denominada “A”: localiza-se no município de São Pedro da Serra - RS com registro no serviço de inspeção municipal, com captação de cinco mil litros de leite / dia, produção semanal de 600 kg de queijo. A agroindústria em questão beneficia leite *in natura* de propriedade rural própria e de outros produtores. A pasteurização do leite era realizada em pasteurizador de placas, a 72°C por 15 segundos com posterior resfriamento à 32°C.

A agroindústria denominada “B”: localiza-se no município de Teutônia - RS com registro no serviço de inspeção municipal, com produção de 800 litros de leite / dia, produção semanal de 150 kg de queijo. A pasteurização do leite era realizada a 65°C por 30 minutos com posterior resfriamento à 32-35°C.

4.2 Listas de Verificações

Para avaliação e posterior comparação entre as agroindústrias, foi aplicada a Lista de Verificação das BPF em Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos, presente no Anexo I da RDC N° 275, de 21 de outubro de 2002, da ANVISA (BRASIL, 2002).

Os itens presentes na lista de verificações foram agrupados por assuntos em cinco blocos: (i) edificações e instalações; (ii) equipamentos, móveis e utensílios; (iii) manipuladores; (iv) produção e transporte de alimentos; (v) documentação. Em cada bloco foram avaliados os seguintes itens:

- **Edificações e instalações:** piso, teto, janelas, aberturas, instalações sanitárias, iluminação, ventilação, controle de pragas e vetores e higiene das instalações;

- **Equipamentos, móveis e utensílios:** bancadas, mesas, maquinários, protocolos de higiene destas estruturas;
- **Manipuladores:** vestuário, hábitos de higiene, estado de saúde, programas de capacitação e supervisão;
- **Produção e transporte:** matéria-prima, fluxo de produção e produto final, como rotulagem e armazenamento;
- **Documentação:** presença e implantação do Manual de BPF e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO).

A RDC N°275/2002 possui 164 itens para avaliação do estabelecimento. No trabalho em questão foram avaliados 159, representando 97% dos itens da legislação. Foram excluídos os itens referentes ao transporte do produto final, uma vez que em ambas as agroindústrias a venda era direta ao consumidor ou realizado por terceiros.

Os itens pertencentes a cada bloco foram tabulados como:

- **Sim:** quando o item especificado foi atendido pela agroindústria;
- **Não:** quando o item ou qualquer característica não foi atendido;
- **Não-aplicável:** quando o item não foi pertinente à avaliação da agroindústria estudada.

Em cada agroindústria, foram realizadas quatro aplicações das Listas de Verificações sendo uma na primeira visita, uma na última visita e duas no decorrer das coletas com intervalo aproximado de três meses entre elas e sem intervenção durante esse período. A tabulação da lista de verificação e a classificação dos resultados foram realizados individualmente para cada agroindústria.

O cálculo da pontuação para classificação das agroindústrias quanto ao atendimento das BPF foi considerado a soma total dos itens referentes às respostas SIM, de acordo a equação utilizada por Rossi (2006):

$$\text{Atendimento}(\%) = \frac{\text{Total de SIM}}{\text{Total de itens} - \text{itens NA}} \times 100$$

4.3 Coleta das Amostras

Foram coletadas amostras de leite *in natura*, massa, queijo com sete dias de maturação e queijo colonial (pronto para consumo). Foram coletados aproximadamente 200 gramas ou mL de cada amostra e acondicionados em frascos estéreis, mantidos sob refrigeração. As amostras de queijo colonial foram coletadas em embalagens fechadas. No momento da coleta, foi mensurada e registrada a temperatura em que os alimentos eram mantidos (termômetro digital *Instrutherm* – TE-300).

A técnica de coleta da superfície com suabe foi utilizada para as amostras em equipamentos e manipuladores, adotando procedimento descrito no *Compendium of Methods for the Microbiologic Examinations of Foods* (DOWNES & ITO, 2001). Foram coletadas amostras das seguintes superfícies de produção: tanque de coagulação, mesa de produção, formas e superfície da prateleira de maturação dos queijos. A área coletada foi o equivalente a 50 cm². Os suabes foram umedecidos em água peptonada 0,1% (AP-HIMÉDIA®) para posterior coleta e armazenados em frascos contendo 10 mL desta solução (diluição 10⁰). O material do tanque de coagulação e da mesa de produção era de aço inoxidável, o das formas de polietileno e o das superfícies de maturação de madeira, em ambas as agroindústrias.

A área de análise da superfície das mãos dos manipuladores foi a superfície total da palma e dos dedos. De forma angular, o suabe previamente umedecido em água peptonada 0,1% (AP-HIMÉDIA®), foi passado, com movimentos giratórios, da parte inferior da palma até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. A coleta das amostras das superfícies de produção e dos manipuladores foi realizada no momento do processo de produção. Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS sob Nº 32369514.2.0000.5347 (APENDICE II).

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Hospital Veterinário da ULBRA.

4.4 Processamentos das Amostras

Para as análises microbiológicas foram coletadas amostras das principais etapas de produção do queijo colonial. As etapas coletadas e as análises

microbiológicas realizadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Etapas e análises microbiológicas correspondentes realizadas nas duas agroindústrias produtoras de queijo colonial pesquisadas.

	Agroindústria A				Agroindústria B			
	Leite cru	Massa	Queijo em maturação	Queijo colonial	Leite cru	Massa	Queijos em maturação	Queijo colonial
Coliformes 30°C	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+
Coliformes 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Mesófilos aeróbios	+	+	+	+	+	+	+	+
SCP ³	+	+	+	+	+	+	+	+
Fungos	+	- ²	-	+	+	-	-	+
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> sp.	+	-	-	+	+	-	-	+

1: + Análises microbiológicas realizadas nas etapas de produção do queijo colonial; 2: - Análises microbiológicas não realizadas; 3: SCP *Staphylococcus coagulase* positiva.

Nas amostras coletadas das superfícies de produção e das mãos dos manipuladores foi realizada a pesquisa de *E. coli*, SCP e SCN.

4.4.1 Diluição Inicial

As amostras foram pesadas ou medidas (25 g ou 25 mL), acrescidas em 225 mL de água peptonada (AP-HIMÉDIA®) 0,1% e homogeneizadas em homogeinizador (*Stomacher* 400®) para posterior diluição decimal seriada até 10⁻⁶. Para as análises dos materiais coletados dos manipuladores, superfícies e equipamentos a inoculação partiu diretamente da amostra inicial (10⁰).

4.4.2. Contagem de Coliformes 30°C, 45°C e Confirmação de *E.coli*

A quantificação de coliformes e pesquisa da *E. coli* nos alimentos foram executadas conforme IN N°62, do MAPA (BRASIL, 2003a). Alíquotas de 1mL das diluições, citadas em 4.4.1, foram colocadas em placa e homogeneizadas em ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose (VRBA–OXOID®) utilizando a técnica de semeadura em profundidade, com sobrecamada. Os cultivos foram incubados a 35°C por 48 horas. Foram selecionados os cultivos que apresentaram entre 15 a 150 unidades formadoras de colônia (UFC) com morfologia típica de coliformes.

Para quantificação de coliformes à 30°C foram utilizadas três colônias típicas (vermelho púrpura, com 0,5 mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares) e inoculadas em Caldo Bile Verde Brilhante 2% (VB - HIMEDIA®) contendo tubos de Durhan. Os cultivos foram incubados a 35°C em banho de água por 24 horas. A presença de coliformes 30°C foi confirmada pela turvação e formação de gás. A contagem destes microrganismos foi determinada multiplicando-se o número de colônias típicas positivas no caldo verde brilhante pelo inverso da diluição. O resultado foi expresso em \log_{10} UFC mL⁻¹ ou g⁻¹.

A quantificação de coliformes 45°C foi realizada semeando três colônias características (rosa intenso com ou sem presença de precipitado de sais biliares), proveniente das placas de VRBA, em 10 mL de Caldo EC (HIMEDIA®). Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e formação de gás após 24 a 48 horas, em banho de água, a 45°C. O resultado foi determinado através do número de colônias típicas positivas em caldo EC multiplicadas pelo inverso da diluição. O resultado foi expresso em \log_{10} UFC mL⁻¹ ou g⁻¹.

Para a pesquisa de *E. coli* nos alimentos, alíquotas dos tubos positivos para coliformes à 45°C foram inoculadas em ágar eosina azul de metileno (EMB – HIMEDIA®) e incubadas durante 24 horas a 35°C. Após este período, foram selecionadas duas a três colônias características (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico) e repassadas para ágar triptose de soja (TSA-DIFCO®) com incubação por 24 horas a 35°C. Quando confirmada a pureza das colônias foram realizados os seguintes testes: morfologia celular e coloração de Gram, motilidade, produção de indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e ágar citrato (APÊNDICE II). Os resultados foram interpretados de acordo com MacFaddin (2001).

Para o isolamento de *E. coli* dos materiais coletados das superfícies de produção e mãos dos manipuladores foram semeados 0,1 mL da amostra (10^0) em ágar MacConkey (HIMEDIA®). As colônias típicas (colônias rosas à vermelhas podendo estar cercada de uma zona de precipitação biliar) foram isoladas e também submetidas aos testes fenotípicos e bioquímicos. Os resultados foram interpretados de acordo com MacFaddin (2001). Os isolados de *E.coli* e outros Gram negativos identificados fenotipicamente foram armazenados em Caldo infusão de cérebro e coração (BHI-HIMEDIA®) adicionado de 30% de glicerol e mantidos em freezer a -18°C, para posterior análise pelo método de MALDI-TOF.

4.4.3 Contagem de Mesófilos Aeróbios

A contagem de mesófilos aeróbios seguiu a IN Nº62, do MAPA (BRASIL, 2003b). Alíquotas de 1mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram adicionadas em placa e homogeneizadas em ágar para contagem (PCA-HIMEDIA®) utilizando a técnica de semeadura em profundidade, com sobre camada. Os cultivos foram incubados a 35°C por 48 horas. A contagem destes microrganismos foi determinada multiplicando-se o número de UFC pelo inverso da diluição. O resultado foi expresso em \log_{10} UFC mL⁻¹ ou g⁻¹.

4.4.4 Quantificação e Isolamento de *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Para quantificação de SCP nos alimentos, alíquotas de 0,1 mL, das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , foram inoculadas em ágar Baird-Parker (OXOID®) pelo método de espalhamento em superfície (BRASIL, 2003a). Para as análises das amostras coletadas das superfícies e equipamentos de produção e mãos dos manipuladores de alimentos, a inoculação inicial partiu diretamente da amostra (10^0). Estas amostras foram submetidas previamente à agitação por 2 minutos antes da inoculação em ágar Baird-Parker (OXOID®).

Foram isoladas três colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro) e atípicas em ágar sangue (ágar base ACUMEDIA® com sangue de carneiro desfibrinado (LABORCLIN®) para análise da pureza e verificação da produção de hemólise. As colônias foram mantidas em ágar BHI (HIMEDIA®) para realização dos seguintes testes fenotípicos (bioquímicos/fisiológicos): coloração de

Gram, catalase, coagulase em lâmina, coagulase em tubo e metabolismo de carboidratos (manitol, trealose, xilose, maltose, lactose, sacarose e manose) (APENDICE III). Para prova da coagulase em tubo foram observados os critérios propostos pela IN N°62 do MAPA com leituras em cada 1 hora até 6 horas. O resultado final foi obtido através do número de colônias típicas contadas multiplicadas por 10, inverso da diluição inoculada, percentagem de colônias confirmadas e expresso em \log_{10} UFC mL⁻¹ ou g⁻¹.

Após a confirmação fenotípica, as culturas puras de SCP e também de SCN foram armazenadas em Caldo BHI (HIMEDIA®) adicionado de 30% de glicerol em freezer a -18°C, para posterior identificação pelo método de MALDI-TOF e análises genotípicas para detecção de genes para enterotoxinas.

4.4.5 Contagem de Fungos

Para quantificação de fungos filamentosos e leveduras foram utilizadas alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁶ inoculadas em ágar batata dextrose acidificado (HIMEDIA®). Os cultivos foram incubados a 25°C por sete dias, para posterior quantificação (SILVA et al., 2010). O resultado final foi obtido através do número de UFC contadas, multiplicadas por 10 e pelo inverso da diluição inoculada e expresso em \log_{10} UFC mL⁻¹ ou g⁻¹. Não foram feitas identificações dos fungos.

4.4.6 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada empregando o método da IN N°62 (BRASIL, 2003a). Foram aliqüotadas/pesadas 25 mL ou g das amostras de leite cru e queijo, transferidas para sacos plásticos estéreis contendo 225mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (BLEB- enriquecimento primário - OXOID®). Esses materiais foram homogeneizados e incubados a 30°C por 48 horas. Alíquotas de 0,1 mL destas amostras foram inoculadas em Caldo Fraser (enriquecimento secundário - OXOID®) e incubadas por 24 horas a 35°C para posterior semeadura em meios sólidos seletivos: ágar Palcam (DIFCO®) e ágar Oxford (OXOID®).

Foram identificadas as colônias típicas da *Listeria* sp. (esféricas, 1-3mm de diâmetro, pretas, com halo enegrecido referente à hidrólise da esculina) para isolamento em TSA (HIMÉDIA®) acrescido de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE)

e incubadas a 30°C por 24 horas. Após esse período foi realizada a observação dos cultivos sob luz oblíqua para selecionar as colônias típicas de coloração azulada. As colônias características de *Listeria* sp. foram mantidas puras em TSA-YE para utilização em provas de identificação.

A partir destes tubos foram realizados os testes bioquímicos/fisiológicos para confirmação do microrganismo e diferenciação de espécies: motilidade, nitrato, ágar triplice açúcar ferro, verificação de hemólise, fermentação de carboidratos (manitol, ramnose, xilose) e teste CAMP (MAcFADDIN, 2001). Os resultados foram expressos por ausência ou presença de *L. monocytogenes* em 25 mL ou g da amostra.

4.4.7 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada utilizando o método proposto pela IN N°62 (BRASIL, 2003).

Foram aliqüotadas/pesadas 25 mL ou g das amostras de leite cru e queijo, adicionadas em sacos plásticos estéreis contendo 225 mL de solução salina peptonada 1% (pré-enriquecimento) com posterior incubação de até 20 horas a 36 ± 1°C. Para o enriquecimento em meio seletivo foi utilizado meio caldo selenito cistina (HIMEDIA®) e caldo Rappaport Vassiliadis (HIMEDIA®) com a utilização de alíquotas de 1 mL e 0,1 mL do pré-enriquecimento, respectivamente, com incubação de 41 ± 0,5°C por 24 horas. A semeadura em meio sólido seletivo/diferencial foi realizada em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD-DIFCO®) com incubação à 35°C por 24 horas. Após o período de incubação foram selecionadas colônias típicas de *Salmonella* sp., inoculadas em ágar e submetidas a coloração de Gram e aos testes bioquímicos/fisiológicos: motilidade, produção de H₂S, indol, urease, fenilalaninadeaminase e oxidase (MAcFADDIN, 2001). Os resultados foram expressos por ausência ou presença de *Salmonella* sp. em 25 g ou mL da amostra.

4.5 Identificação dos Isolados pelo Método de Espectrometria de Massa com Fonte de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Analisador de Massas do Tipo Tempo de Vôo

Foram selecionados isolados de *E. coli*, SCP e SCN identificados fenotipicamente para submetê-los ao método do MALDI-TOF. Os isolados,

primeiramente, foram cultivados em caldo BHI e, após três semeaduras consecutivas em ágar sangue.

O método de MALDI-TOF, nestes isolados, foi realizado pela técnica de extração, em duplicata. Foram coletadas amostras das colônias, que foram lavadas duas vezes com água Milli-Q estéril, com posterior centrifugação a 16000g durante 1 min. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi re-suspenso em 300 µL de água Milli-Q estéril. Em seguida, as bactérias foram inativadas com a adição de 900 µL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich®). Após centrifugação a 16000g durante 2 min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi seco ao ar à temperatura ambiente durante 10min. As proteínas celulares foram extraídas adicionando-se ao sedimento o volume de 10 µL de ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich®) e, após homogeneização, adição de 10 µL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich®). Após nova centrifugação a 16000g durante 2min, aplicou-se 1µL do sobrenadante em poço da placa de MALDI (Bruker®), deixando-se secar ao ar ambiente. Cada amostra foi coberta com 1µL da matriz para MALDI (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico- Sigma-Aldrich®), na concentração de 5mg/mL em solução contendo 50% de acetonitrila, 2,5% de ácido trifluoracético (v/v), subsequente secagem ao ar.

Os espectros brutos foram processados usando o programa MALDI Biotyper 4.0 (Bruker®) com as configurações padrão. Para identificar as bactérias desconhecidas, cada lista de picos gerada foi comparada diretamente com a lista de picos dos espectros de referência, denominados MSP (Main Spectra Projections), presentes na biblioteca IVD (In Vitro Diagnostic System, Bruker) integrada, por meio do algoritmo Biotyper. Nesse processamento, foi realizada a correspondência de padrões de picos, utilizando a posição, as distribuições de intensidade e a frequência de picos, atribuindo-se os escores de classificação.

A identificação pela técnica de MALDI-TOF dos isolados deste trabalho foi realizada no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS.

4.6 Detecção de Genes para Enterotoxinas em *Staphylococcus* sp.

4.6.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído pela técnica da fervura conforme Hassanzadeh et al. (2016) a partir de isolados de *Staphylococcus* sp. Estes isolados foram reativados, primeiramente, em caldo BHI e três sementeiras consecutivas em ágar sangue. Para realização da extração, colônias puras de *Staphylococcus* sp. foram isoladas em TSA a 35°C por 24 horas. A colônia foi homogeneizada em 300 µL de tampão TENT (10mM Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA; 5% (v/v) Triton X100; pH 8.0) e inserida em termobloco à 99,9°C por 5 minutos com posterior centrifugação. O sobrenadante foi adicionado em outro tubo, contendo etanol 95% sendo mantida a amostra à -20°C por 20 minutos. Após centrifugação o DNA foi diluído em 50 µL de água destilada estéril para posterior realização da PCR.

4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase para Detecção dos Genes das Enterotoxinas A, B, C, D e E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*)

A detecção de genes para enterotoxinas de *Staphylococcus* foi realizada pela reação PCR utilizando conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores descritos por Moura et al. (2012) (Tabela 2).

As reações de PCR foram otimizadas em um volume final de 25 µL e continham 1 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 U de TaqDna polimerase (Invitrogen®), 1x tampão (Invitrogen®), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene®) e água deionizada estéril (Milli Q). As amplificações foram realizadas em Termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) nas seguintes condições:

- ***sea***: cinco minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 54°C, 45 segundos a 72°C e extensão final de cinco minutos a 72°C. Como controle positivo foi utilizado cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (*sea*);
- ***seb*, *sec*, *sed*, *see***: cinco minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C e extensão final de cinco minutos a 72°C. Como controles positivos foram utilizados cepas de

Staphylococcus aureus ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*).

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores¹, temperaturas de anelamento e tamanho de fragmentos esperados para a amplificação de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* sp.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	T (°C) ²	Fragmento (pb) ³
<i>Sea</i>	5'-CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG- 3' 5'-CTG AAC CTT CCC ATC AAA AAC- 3'	54	126
<i>Seb</i>	5'-GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC- 3' 5'-TTC GCA TCA AAC TGA CAA ACG- 3'	55	475
<i>Sec</i>	5'-AGA ACT AGA CAT AAA AGC TAG G- 3' 5'-TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC- 3'	55	267
<i>Sed</i>	5'-TTT GGT AAT ATC TCC TTT AAA CG- 3' 5'-CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC- 3'	55	309
<i>See</i>	5'-CCT ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC- 3' 5'-TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC- 3'	55	173

1: Moura et al., 2012.

2: °C temperatura de anelamento em graus centígrados.

3: pb: pares de bases.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata. As análises referente à detecção dos genes para enterotoxinas em *Staphylococcus* sp. foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) na ULBRA.

4.7 Análises dos Dados

As agroindústrias foram avaliadas e classificadas quanto ao grau de atendimento à RDC N°275 (BRASIL, 2002) que segue a classificação presente na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação dos estabelecimentos utilizada na avaliação das duas agroindústrias após análise da lista de verificação de BPF, conforme o grau de atendimento à RDC n°275.

Classificação	Pontuação (%)
Grupo 1	76 a 100
Grupo 2	51 a 75
Grupo 3	0 a 50

Fonte: Brasil (2002).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de 5% de significância, utilizando-se um modelo linear generalizado para dados logarítmicos. Foram testados os efeitos fixos de cada etapa e indústria, assim como sua interação, quanto: coliformes 30°C e 45°C, quantificação de mesófilos aeróbios, SCP e fungos, presença ou ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp.

As coletas foram consideradas com efeito de repetição. Quando detectadas diferenças entre etapa ou agroindústria, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico JMP (v.12).

Foram adotados os critérios microbiológicos estabelecidos para queijos de alta umidade, entre 46% e 54,9%, com amostragem indicativa, seguindo os padrões microbiológicos sanitários para alimentos previstos na RDC N°12 (BRASIL, 2001; SILVEIRA JÚNIOR, 2012; SOARES et al., 2013; SEIXAS et al., 2015).

Em relação aos resultados do MALDI-TOF, as análises por Biotyper® foram classificadas utilizando os valores de escore propostos pelo fabricante representado na Tabela 4.

Tabela 4: Níveis de confiança atribuídos à identificação a partir de uma correlação dos escores dos espectros obtidos do microrganismo de interesse com os do banco de dados do MALDI-TOF Biotyper.

Escores	Descrição
2.300 – 3.000	Identificação segura para espécie
2.000 – 2.299	Identificação segura para gênero Provável identificação para espécie
1.700 – 1.999	Provável identificação para gênero
0 – 1.699	Nível de confiança insuficiente para identificação

4.8 Normas de Segurança no Laboratório

Os microrganismos foram manipulados por pessoal qualificado e treinado, com uso de equipamento de proteção individual e coletiva, utilizando material descartável, capela de fluxo laminar certificada e acesso restrito no local. O material biológico foi descartado após esterilização por autoclave. Os produtos químicos e embalagens utilizadas nesta pesquisa foram armazenados separadamente com devida identificação e descartados pelo setor responsável pela eliminação de rejeitos físicos e químicos da ULBRA, seguindo as normas do CONAMA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Lista de Verificações

A arquitetura dos equipamentos e das instalações, as condições higiênicas do ambiente de trabalho, as técnicas de manipulação dos alimentos e a saúde dos funcionários são alguns dos fatores importantes que devem ser avaliados durante a produção de alimentos seguros, devendo, portanto, serem considerados na aplicação e avaliação das BPF em estabelecimentos de produção ou de comercialização de alimentos, um subsídio para a qualificação e triagem de fornecedores como base para vistoria fiscal sanitária e para a verificação, pelo próprio estabelecimento, do cumprimento das BPF (TOMICH et al., 2005; OLIVEIRA & MAGRIZE, 2014).

Os resultados obtidos nos itens avaliados nas quatro aplicações da Lista de verificação não apresentaram variações durante a pesquisa. Assim, os dados foram tabulados e representados de forma conjunta. Estes dados encontram-se no APENDICE III. A Figura 1, demonstra a porcentagem de conformidades atendidas pela agroindústria A e B em cada bloco analisado.

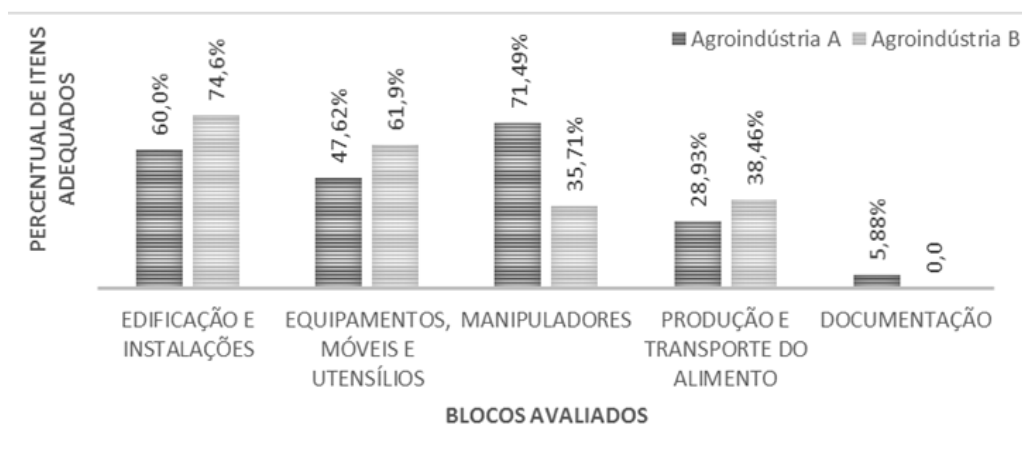


Figura 1: Percentual de adequação obtido na aplicação da lista de verificações das boas práticas de fabricação nas agroindústrias A e B.

Como resultado geral as agroindústrias A e B apresentaram, respectivamente, 47% e 53% dos itens avaliados em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação. Assim, a classificação destes estabelecimentos conforme o grau de atendimento à RDC N°275 (BRASIL, 2002) foi

no Grupo 3 e Grupo 2, respectivamente (Tabela 3). No resultado geral as agroindústrias apresentaram uma baixa adequação à legislação federal vigente. Analisando os blocos com os itens de verificação, individualmente, foi observado que nenhum pode ser classificado no Grupo 1, com adequações superiores a 76% à legislação (BRASIL, 2001).

No bloco “Edificações e instalações”, as agroindústrias apresentaram resultado semelhante (Grupo 2). Comum às agroindústrias destacam-se as áreas externas com focos de insalubridade, objetos em desuso e presença de animais. Como consequência, estas deficiências, podem causar a atração de vetores e pragas urbanas comprometendo a higiene do ambiente (COSTA et al., 2013). Dos itens que apresentaram conformidade neste bloco destaca-se o leiaute adequado ao processo produtivo considerando a capacidade/volume de produção, a distribuição das dependências e a área de expedição. A distribuição física de elementos e fluxo de produção são quesitos que, se não conforme, podem oferecer risco de contaminação cruzada comprometendo a qualidade do alimento (BRASIL, 1998).

A avaliação do bloco “Equipamentos, móveis e utensílios” revelou para as duas agroindústrias, falhas no processo de higienização, bem como a inexistência de registros desta higienização, o que merece alerta já que superfícies contaminadas podem possibilitar a ocorrência de contaminação cruzada. Ferramentas de controle, como o Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPOH), são imprescindíveis para promoção de higiene em linhas de processamento de alimentos. Os PPOH devem ser desenvolvidos, implantados e monitorados, pois auxiliam a evitar a contaminação direta ou cruzada da superfície para o alimento (BRASIL, 2003b).

Quanto à avaliação do bloco “Manipuladores”, a agroindústria (B) classificada no Grupo 3, contava exclusivamente com mão de obra familiar, o que demonstra claramente a forma artesanal de produção. Os manipuladores dessa agroindústria não faziam uso de uniforme completo e não possuíam capacitação específica. Na outra agroindústria (A) a mão de obra não era exclusivamente familiar. Os funcionários utilizavam uniforme completo e havia o registro de capacitação dos funcionários. Porém, quando realizadas análises microbiológicas das mãos dos manipuladores, o resultado foi semelhante.

As duas agroindústrias não tinham implementado as estratégias de controle

de saúde dos manipuladores. O controle de saúde dos manipuladores é parte importante do Programa de BPF que compreende aos exames periódicos e os controles diários das condições das mãos dos manipuladores, como higiene e afecções cutâneas, uma vez que podem conter contaminantes em potencial. Falhas nas posturas dos manipuladores de alimentos, o que se torna recorrente e preocupante pelo risco ao produto final (PINTO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2017).

As agroindústrias foram classificadas no Grupo 3 no bloco “Produção e transporte do alimentos”, sendo que as principais irregularidades se referiam ao controle de qualidade do produto final. Os estabelecimentos avaliados não apresentaram laudo atestando qualidade do produto final ou programa de amostragem para análise laboratorial.

A existência e implementação de PPOH e Manual de BPF foi avaliada pelo item “Documentação”. A Agroindústria A possuía MBPF e alguns PPHO, mas as rotinas de produção e controles não cumpriam as orientações descritas nesses documentos. A outra agroindústria avaliada não possuía nenhum dos documentos avaliados nesse item, portanto estava totalmente inadequada com a legislação. A elaboração e implementação de programas de qualidade visa garantir adequadas condições higiênicas sanitárias necessárias para produzir alimentos seguro.

5.2 Análises Microbiológicas

Em relação às etapas de produção foram analisadas 75 amostras da agroindústria A e 64 amostras da agroindústria B. As amostras coletadas dos manipuladores totalizaram 32 em cada agroindústria, sendo utilizado o plano de amostragem de dois funcionários por agroindústria. Das superfícies das etapas de produção do queijo colonial foram coletadas 64 amostras de cada agroindústria. O número de amostras coletadas nas etapas de produção, manipuladores e superfícies de produção estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Número de amostras coletadas de cada etapa de produção, manipuladores e superfícies de produção das agroindústrias produtoras de queijo colonial analisadas.

	Etapas de produção					Manipuladores/ Superfícies					
	Leite cru	Massa	Queijo em maturação	Queijo colonial	TOTAL	Manipuladores	Tanque de produção	Forma	Mesa de produção	Superfície de maturação	TOTAL
Agroindústria A	16	17	18	24	75	32	16	16	16	16	96
Agroindústria B	16	16	16	16	64	32	16	16	16	16	96

As agroindústrias apresentavam o processo de produção do queijo colonial semelhante, onde a massa era produzida com a adição do coalho, culturas iniciadoras, cloreto de cálcio e cloreto de sódio. As culturas utilizadas pelas agroindústrias eram fermento láctico mesofílico misto liofilizado (Coalhopar®) composto por: *Lactococcus lactis lactis*; *L. lactis cremoris* e *Lactococcus lactis diacetylactis*. A massa produzida era enformada e submetida ao processo de dessora por 24 horas. Após este período, o queijo era submetido à salga pelo método da salmoura e posterior maturação. O período de maturação variava entre sete e dez dias. As amostras coletadas para análise, nesta etapa, eram referentes ao sétimo dia do período de maturação.

As médias de temperatura obtidas na em cada etapa e os resultados das análises microbiológicas nas agroindústrias analisadas nas distintas etapas estão descritas nas Tabelas 6 a 9.

Tabela 6: Médias e intervalo de valores mínimos e máximos obtidos das análises microbiológicas e temperatura das amostras de leite cru, massa e queijo em maturação das etapas de produção do queijo colonial nas agroindústrias A.

Análises	Leite cru (n ¹ =16)	Massa (n=17)	Queijo em maturação (n=18)
Temperatura (°C)	9,9	18,4	11,5
(min-máx) ²	(8-13)	(18-20)	(10-17)
Coliformes 30°C ³	4,3	2,8	4,0
(min-máx)	(<1,0-5,3)	(<1,0-6,0)	(<1,0-7,5)
Coliformes 45°C ³	2,9	2,4	3,0
(min-máx)	(<1,0-6,0)	(<1,0-5,0)	(<1,0-6,4)
<i>E.coli</i> ⁴	aus ⁵	aus.	aus.
Mesófilas aeróbias ³	5,9	5,7	6,5
(min-max)	(<1,0-7,2)	(<1,0-8,3)	(4,9-7,5)
SCP ^{3,4}	2,6	2,2	2,8
(min-max)	(<1,0-5,14)	(<1,0-6,0)	(<1,0-6,57)
Fungos ³	4,1	nr ⁶	nr
(min-máx)	(<1,0-5,69)		
<i>L. monocytogenes</i>	aus.	nr	nr
<i>Salmonella sp.</i>	aus.	nr	nr

1: número de amostras analisadas; 2: intervalo dos valores mínimos e máximos obtido nas amostras analisadas; 3: log₁₀UFC mL/g⁻¹; percentual (%) de amostras com presença de *E.coli*; 4: *Staphylococcus coagulase positiva*; 5: ausência da bactéria em 25 g/mL; 6: não realizado.

Tabela 7: Médias e intervalo de valores mínimos e máximos obtidos das análises microbiológicas e temperatura das amostras de leite cru, massa e queijo em maturação das etapas de produção do queijo colonial nas agroindústrias B.

Análises	Leite cru (n ¹ =16)	Massa (n=16)	Queijo em maturação (n=16)
Temperatura (°C)	4,7	5,0	8,4
(min-máx) ²	(3,5-7,0)	(4,0-6,0)	(8,0-13,0)
Coliformes 30°C ³	3,1	1,9	3,5
(min-máx)	(<1,0-4,84)	(<1,0-6,30)	(<1,0-7,04)
Coliformes 45°C ³	1,3	1,4	2,2
(min-máx)	(<1,0-2,34)	(<1,0-5,25)	(<1,0-4,39)
<i>E.coli</i> ⁴	aus ⁵	aus.	aus.
Mesófilas aeróbias ³	5,2	6,3	7,6
(min-max)	(2,69-6,69)	(<2,0-7,3)	(4,41-8,65)
SCP ^{3,4}	2,7	2,0	2,1
(min-max)	(<2,0-3,07)	(<2,0-3,0)	(<2,0-3,0)
Fungos ³	2,8	nr ⁶	nr
(min-máx)	(<2,0-3,84)		
<i>L. monocytogenes</i>	aus.	nr	nr
<i>Salmonella sp.</i>	aus.	nr	nr

1: número de amostras analisadas; 2: intervalo dos valores mínimos e máximos obtido nas amostras analisadas; 3: log₁₀UFC mL/g⁻¹; percentual (%) de amostras com presença de *E.coli*; 4: *Staphylococcus coagulase positiva*; 5: ausência da bactéria em 25 g/mL; 6: não realizado.

A temperatura de fabricação e armazenamento é um dos fatores que pode comprometer o produto final (SANGALETTI et al., 2009). A temperatura não seguiu o mesmo padrão de resposta nas duas agroindústrias (Tabela 6 e Tabela 7) apresentando diferenças entre as etapas e entre as agroindústrias (P<0,0001). As

médias das amostras coletadas na agroindústria A apresentaram maiores temperaturas que as médias das amostras da agroindústria B. Entre as etapas, a massa coletada na agroindústria A obteve a maior temperatura que pode, entre outras causas, estar relacionado com a deficiência no sistema de ventilação ambiental detectado na aplicação da Lista de Verificação.

Como consequência, as contagens de coliformes 30°C e 45°C e fungos foram superiores na agroindústria A, em relação à B. A contagem de coliformes 30°C diferiu entre as agroindústrias e entre as etapas ($P < 0,05$), enquanto que o número de coliformes 45°C diferiu entre as agroindústrias ($P = 0,0003$) (Tabela 6 e Tabela 7).

O leite cru e a massa apresentaram as menores temperaturas na agroindústria B (Tabela 6 e Tabela 7). O leite cru produzido por esta agroindústria era ordenhado, refrigerado e processado no mesmo dia. Na agroindústria A, o leite cru permanecia estocado por até 24 horas. Conforme estabelece a IN Nº62/2011 o leite deve ser processado até 24 horas após a ordenha, à uma temperatura máxima de 7°C na indústria (BRASIL, 2011b). Assim pode-se observar que agroindústria B mantinha o padrão exigido pela legislação vigente para matéria-prima. A refrigeração do leite por períodos prolongados e/ou em temperatura inadequada, como o que foi verificado na agroindústria A, pode comprometer a qualidade da matéria-prima e do produto final (BONOFOH et al., 2003; TESSER et al., 2016).

Quando comparadas as etapas de processamento, observou-se maior número de coliformes 30°C no leite cru e no queijo em maturação nas duas indústrias, sem diferir no queijo colonial. Menor quantidade de coliformes 30°C foi observada na massa. Para coliformes à 45°C, não foi observada diferença na contagem entre as etapas ($P > 0,05$) (Tabela 6 e Tabela 7).

Em relação ao queijo colonial (Tabela 8 e Tabela 9), produto vendido diretamente ao consumidor, a agroindústria B manteve a média da temperatura dentro da estabelecida pela legislação para a maioria dos queijos, ou seja, não superior a 12°C. Este fator pode ter influenciado nos resultados das análises obtidos, principalmente, para coliformes e fungos.

A contagem de coliformes à 30°C não é exigida pela legislação vigente, porém auxilia na avaliação higiênico-sanitária da produção uma vez que são classificados, na sua maioria, como ambientais. A presença de coliformes pode

sugerir a identificação de possíveis patógenos ou deteriorantes estando associados à decomposição de queijos, causando fermentações exacerbadas com estufamento precoce dos produtos, além de intoxicações alimentares (OKURA et al., 2006; SILVA et al., 2006; BRANT et al., 2007; MELO et al., 2013).

Na análise dos resultados obtidos na quantificação de coliformes 45°C (Tabela 07), classificando o queijo colonial com teor de alta umidade, 33% das amostras na agroindústria A e 12,5% na agroindústria B apresentaram valores acima do limite da legislação ($3,69 \log_{10} \text{UFC/g}^{-1}$) sendo classificados como impróprios para consumo.

Tabela 8: Temperatura obtida durante a coleta e resultados das análises microbiológicas das amostras analisadas do queijo colonial da agroindústria A.

Amostra	Temperatura (°C)	Coliformes 30°C ¹	Coliformes 45°C ¹	Mesófilas aeróbias ¹	SCP ^{1,2}	Fungos ¹	L. monocytogenes	Salmonella sp.
01	12,0	<1.0	<1.0	6.00	< 2.0	< 2.0	aus. ³	aus.
02	13,0	3.00	2.60	6.55	2.30	2.30	aus.	aus.
03	14,0	<1.0	<1.0	6.30	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
04	14,0	<1.0	<1.0	6.55	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
05	16,0	4.90	4.40	5.00	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
06	12,0	4.45	3.85	6.30	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
07	14,2	4.70	4.25	6.55	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
08	12,0	3.20	2.50	6.55	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
09	15,0	4.10	4.10	5.00	< 2.0	3.95	aus.	aus.
10	16,7	4.70	3.70	4.00	< 2.0	3.75	aus.	aus.
11	17,0	3.60	3.30	6.55	< 2.0	0.60	aus.	aus.
12	13,0	3.75	3.45	4.80	< 2.0	3.30	aus.	aus.
13	13,0	2.80	2.05	5.50	< 2.0	3.80	aus.	aus.
14	16,0	3.30	2.50	5.80	< 2.0	4.50	aus.	aus.
15	12,0	0.90	0.80	6.50	< 2.0	3.50	aus.	aus.
16	13,0	<1.0	<1.0	5.30	< 2.0	4.95	aus.	aus.
17	12,0	0.60	0.50	6.55	< 2.0	2.60	aus.	aus.
18	18,0	2.50	2.20	8.0	< 2.0	2.70	aus.	aus.
19	15,0	<1.0	<1.0	8.24	< 2.0	3.00	aus.	aus.
20	12,0	2.84	<1.0	8.34	< 2.0	2.00	aus.	aus.
21	12,0	5.25	4.30	8.14	< 2.0	5.50	aus.	aus.
22	15,0	6.55	6.25	8.50	< 2.0	4.00	aus.	aus.
23	13,0	<1.0	<1.0	8.57	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
24	14,0	2.85	2.85	8.74	< 2.0	< 2.0	aus.	aus.
Média	15,1	2,9	2,5	6,6	2,0	2,9	aus.	aus.

1: log₁₀UFC/g⁻¹; 2: *Staphylococcus coagulase positiva*; 3: ausência da bactéria em 25 g;

Tabela 9: Temperatura obtida durante a coleta e resultados das análises microbiológicas das amostras analisadas do queijo colonial da agroindústria B.

Amostra	Temperatura (°C)	Coliformes 30°C ¹	Coliformes 45°C ¹	Mesófilas aeróbias ¹	SCP ^{1,2}	Fungos ¹	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> sp.
01	6,0	2,84	2,00	7,95	<2,0	3,30	aus. ³	aus.
02	6,0	<1,0	<1,0	7,30	<2,0	3,11	aus.	aus.
03	8,0	<2,0	<2,0	<1,0	2,00	3,10	aus.	aus.
04	8,0	<2,0	<2,0	8,34	<2,0	2,84	aus.	aus.
05	8,0	2,77	2,17	7,60	2,84	2,38	aus.	aus.
06	8,0	2,51	2,00	6,87	2,60	1,84	aus.	aus.
07	5,0	3,74	3,65	6,60	<2,0	2,88	aus.	aus.
08	5,0	3,73	3,53	6,30	<2,0	2,69	aus.	aus.
09	12,0	3,60	<1,0	8,00	<2,0	2,68	aus.	aus.
10	12,0	3,47	3,00	8,04	<2,0	2,77	aus.	aus.
11	10,0	2,75	2,75	6,93	<2,0	3,00	aus.	aus.
12	10,0	<1,0	<1,0	<1,0	<2,0	<2,0	aus.	aus.
13	11,0	2,25	2,64	7,60	<2,0	2,30	aus.	aus.
14	11,0	<1,0	<1,0	7,85	<2,0	2,27	aus.	aus.
15	7,0	3,90	3,90	7,47	<2,0	2,00	aus.	aus.
16	7,0	5,65	5,14	8,30	<2,0	2,17	aus.	aus.
Média	9,3	2,6	2,3	6,7	2,1	2,6	aus.	aus.

1: log₁₀UFC /g⁻¹; 2: *Staphylococcus coagulase positiva*; 3: ausência da bactéria em 25 g;

No queijo colonial, produto pronto para o consumo, na agroindústria A foi possível o isolamento e identificação da *E. coli* em 8,3% das amostras, enquanto que na agroindústria B este microrganismo não foi confirmado. As amostras com a presença da *E. coli* foram as que apresentaram quantificação de coliformes 45°C mais elevadas ou seja 4,30 log₁₀ UFC/g⁻¹ e 6,25 log₁₀ UFC/g⁻¹ (amostras 21 e 22; Tabela 07).

Em pesquisa realizada por Neto et al. (2005), pode haver atividade antagonista de bactérias lácticas frente a microrganismo como a *E.coli*. No entanto, Melo et al. (2013) justificou que esta atividade poderá não ser o suficiente para redução total quando o pH, a temperatura e quantificação de microrganismos durante

o processo de maturação estiverem elevados.

Em relação à pesquisa de *E coli* nas superfícies de produção e manipuladores, não foram isoladas em nenhuma das 64 amostras analisadas.

Na quantificação de mesófilos aeróbios e SCP a temperatura do produto acabado não influenciou na quantificação destes microrganismos (Tabela 6 e 7). Porém, o uso de temperaturas incorretas de armazenamento poderia causar descoloração interna do produto, depressões na superfície, modificações do sabor e aroma, produção de manchas devido a proliferação de microrganismos (RONCATTI, 2016). Porém estas características não foram observadas nas amostras de queijo colonial analisadas.

A média das contagens de mesófilas aeróbias nas amostras analisadas foram as que se apresentaram mais elevadas quando comparadas com as demais análises ($P > 0,05$) destacando as etapas do queijo em maturação e queijo colonial (Tabela 6 e 7). Assim, em relação a diferença entre estas etapas, foi considerada significativa ($P < 0,0001$). Quando comparado com a quantificação dos demais microrganismos desta pesquisa, coliformes 30°C, 45°C, SCP e fungos, apresentaram comportamento semelhante. Estes microrganismos são classificados como mesófilos podendo ter contribuído para a contagem de mesófilos aeróbios.

Outro fator que pode ter influenciado na contagem de mesófilos aeróbios é a média do resultado nas amostras de leite cru que nas agríndústrias A e B apresetaram valores acima ($5,9 \log_{10}$ UFC/mL e $5,2 \log_{10}$ UFC/ml, respectivamente) do determinado pela legislação vigente (até $5 \log_{10}$ UFC/mL) (BRASIL, 2011b). Sabe-se que o número de células influencia na eficiência do processo de inativação microbiana (ICMSF, 2015).

Ainda, após a etapa da prensa, a massa era submetida ao tratamento com salmoura para realização da salga. Durante este período, as salmouras podem veicular microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos que causam alterações na qualidade dos queijos. A reutilização das salmouras na indústria é procedimento constante e que gera o aumento das impurezas na solução. Quando um queijo é submerso em salmoura ocorrem diversas trocas entre este e a solução. O cuidado com a salmoura e o conhecimento dos fatores que podem alterar sua qualidade físico-química e microbiológica é fundamental (GUSSO, 2009).

Elevadas quantidades de bactérias mesófilas em alimentos, podem indicar que foram preparados com matéria-prima contaminada, que o processamento foi insatisfatório do ponto de vista sanitário ou ainda, que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura (LEITE et al., 2000). Entretanto, a presença de altos níveis de mesófilos não é usada para analisar as condições sanitárias de produtos lácteos como queijos, cujo processamento é utilizado microrganismos como culturas iniciadoras (ICMSF, 2015).

As amostras analisadas da etapa de maturação foram coletadas no sétimo dia. O aumento de mesófilos também pode estar relacionado com a multiplicação das bactérias lácteas. Os microrganismos deste tipo de fermento tende a se multiplicar durante o processo de maturação do queijo causando, entre outros, o aumento da acidez. Esta acidez beneficia as características do produto por inibir microrganismos patogênicos. Este fator pode ter contribuído para as amostras de queijo colonial analisadas nesta pesquisa permanecerem dentro do padrão legal para contagem de SCP e ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. (SANGALETTI et al., 2009).

A quantificação de SCP foi semelhante entre as agroindústrias ($P > 0,05$), diferindo entre a maioria das etapas analisadas ($P < 0,0001$). Na agroindústria A a média foi mais elevada no queijo durante a maturação inclusive com média maior do que o leite sem tratamento térmico. Na agroindústria B o SCP apresentou maior valor nas amostras coletadas no leite cru e menor valor nas amostras de massa e queijo colonial, sem diferir do queijo em maturação.

Do total de amostras analisadas do queijo colonial nas agroindústrias a quantificação de SCP ficou dentro do padrão da legislação vigente, ou seja, até $3 \log_{10}$ UFCg⁻¹. No entanto das etapas e superfícies de produção foram identificados 29 isolados de SCP confirmados como *S. aureus*.

Em relação a quantificação de fungos houve variação entre as etapas e entre as agroindústrias ($P < 0,0001$). As agroindústrias apresentaram diminuição entre a etapa do leite cru e queijo colonial. Fato este não encontrado por Peixoto et al. (2012) onde os níveis de contaminação nas amostras de queijos foram superiores aos níveis de contaminação nas amostras de leites. Os autores afirmaram que isso ocorreu, provavelmente, devido à contaminação no ambiente de produção dos queijos.

A quantificação de fungos varia de acordo com o tipo de queijo analisado. Ceugniz et al. (2015) analisando o queijo francês “Tomme d’orchies” encontraram média de contagens de $6,43 \log_{10}$ UFC/g⁻¹ de fungos na porção interna das amostras. Já Fadda et al. (2004) analisando leveduras em queijo artesanal (Fiore Sardo) encontraram contagem inicial de $2,64 \log_{10}$ UFC/g⁻¹ e observaram a diminuição das contagens a medida que passaram os meses de maturação.

A presença de fungos, principalmente leveduras, pode ser considerado normal e ainda, auxiliam na maturação dos queijos. Algumas espécies de leveduras apresentam ação antibacteriana frente a patógenos responsáveis por DTAs (FADDA et al., 2004; BONJAR et al., 2015; CEUGNIEZ et al., 2015).

A presença de altas contagens fungos filamentosos e leveduras em queijos pode ser atribuída à, maneira inadequada de armazenamento, refrigeração intercalada de longos períodos de exposição à temperatura ambiente sendo que a água de condensação do refrigerador, favorece ainda mais o crescimento de fungos na superfície dos queijos. Os fungos filamentosos nestes produtos são comuns e podem representar um problema para o fabricante, durante a maturação, bem como para o varejista e consumidor, durante a estocagem, seja ela refrigerada ou não. O desenvolvimento desses microrganismos sempre foi considerado indesejável por causar perdas econômicas devido à descoloração, aparência desagradável (JAHN et al., 2017).

Hocking & Faedo (2008), avaliaram amostras de queijos Cheddar embalados à vácuo durante a maturação, bem como o ar da fábrica e utensílios utilizados durante o processamento dos queijos. Os autores evidenciaram a presença de três fungos predominantes: *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium commune* e *Penicillium glabrum*. Os estudos mostraram que as espécies fúngicas causadoras de deterioração nos queijos também foram encontradas no ambiente da fábrica, equipamentos, ar, salmoura, coalho e soro de leite fornecendo uma ampla gama de fontes potenciais de contaminação. Os mesmos autores também relataram que o ar de baixa qualidade com alto número de contaminantes em salas de produção, especialmente nas salas de maturação, é o principal indicativo de contaminação dos queijos.

Nas agroindústrias analisadas não foram isoladas *Listeria* sp. (incluindo *L.*

monocytogenes) e *Salmonella* sp. nas amostras de leite cru e queijo colonial. Outros autores encontraram resultados semelhantes em queijos (FEITOSA et al., 2003; MARTINS et al., 2015; SEIXAS et al., 2015). Já outros autores relatam o isolamento da *L. monocytogenes* em alimentos, sobretudo em derivados lácteos e o isolamento da bactéria em ambientes de laticínio no Brasil (CARVALHO et al., 2007; ABRAHÃO et al., 2008; NEVES et al., 2008).

Outros autores encontraram em torno de 12% de amostras de queijos com presença da *Salmonella* sp. Assim, devido às características deste microrganismo, como a sensibilidade ao pH ácido, não significa necessariamente que não estejam presentes nas amostras analisadas, mas que não foram detectados utilizando esta metodologia (ORTOLANI et al., 2010; ANTONELLO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012).

O não isolamento da *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. nos alimentos analisados pode estar relacionado a menor capacidade de competição deste microrganismo frente a demais presentes nas amostras como coliformes, mesófilos, fungos e SCP. Em relação a ausência no queijo colonial destaca-se o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas e seus metabólitos produzidos durante o processo em maturação que possivelmente auxiliam no controle da multiplicação de microrganismos. Estes microrganismos são, assim, importantes na obtenção de um alimento seguro (MELO et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

5.3 Identificação dos Isolados de *Staphylococcus* sp.

A identificação pelo método fenotípico tradicional e MALDI-TOF foi realizada em 72 isolados identificados como *Staphylococcus* sp. (Tabelas 10 e 11) (APÊNDICE IV), onde 43% (31/72) eram coagulase positiva. Entre estes SCP, o *S. aureus* foi identificado em 93% dos isolados destacando a etapa do leite cru e do tanque de produção da agroindústria B. A presença de *S. aureus* nas amostras de leite cru pode caracterizar a presença de animais do rebanho cursando com mastite considerando que o *S. aureus* é o agente de maior incidência (CONTRERAS & RODRIGUEZ, 2011; HOGEVEEN et al., 2011). A presença do *S. aureus* na superfície do tanque de produção sugere que o tratamento térmico não foi realizado de forma adequada e/ou, nesta estrutura pode haver a presença do biofilme, característica evidenciada em

pesquisa realizada por Galinari et al. (2014) com amostras de *S. aureus* em laticínios.

Tabela 10: Identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. obtidos das amostras coletadas nas etapas de produção do queijo colonial, superfícies de produção e manipuladores da agroindústria A.

Etapa de produção/superfície	Espécie / (nº de isolados)	Intervalo do escore ¹
Leite cru	<i>S. aureus</i> (3)	2.472- 2.273
	<i>S. intermedius</i> (1)	2.243
	<i>S. haemolyticus</i> (1)	2.027
Tanque de produção	NI ²	
Mesa de produção	<i>S. sciuri</i> (1)	2.121
	<i>S. warneri</i> (1)	2.096
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	2.064
Massa	<i>S. warneri</i> (1)	2.250
	<i>S. caprae</i> (1)	2.232
Forma	<i>S. warneri</i> (2)	2.138-2081
	<i>S. aureus</i> (1)	2.386
Queijo em maturação	<i>S. warneri</i> (1)	2.018
	<i>S. sciuri</i> (1)	2.058
Superfície de maturação	<i>S. equorum</i> (2)	2.032-2.021
	<i>S. aureus</i> (2)	2.357-2.344
Queijo colonial	<i>S. epidermidis</i> (1)	2.332
	<i>S. aureus</i> (2)	2.423-2.362
Manipulador	<i>S. equorum</i> (1)	2.224
	<i>S. warneri</i> (2)	2.212-2.191

1: intervalo do escore obtido pelo método de MALDI-TOF; 2: NI: sem isolamento.

Na agroindústria A foram identificados oito *S. aureus* dos 25 isolados de *Staphylococcus* sp. Além da etapa do leite cru, nas etapas do queijo em maturação, queijo colonial e no manipulador sendo este uma das possíveis causas de contaminação nas etapas, além da possível formação de biofilme. Comportamento semelhante ocorreu na agroindústria B que, apesar de não ser isolado *S. aureus* do queijo colonial, foi possível o isolamento na massa, queijo em maturação e manipulador. Na agroindústria B foram isolados 21 *S. aureus* dos 47 *Staphylococcus* sp. Durante o processo de maturação, os queijos eram manipulados diariamente para modificação da posição sobre a superfície de maturação.

Tabela 11: Identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. obtidos das amostras coletadas nas etapas de produção do queijo colonial, superfícies de produção e manipuladores da agroindústria B.

Etapa de produção	Espécies/ (n° de isolados)	Intervalo do escore ¹
Leite cru	<i>S. aureus</i> (12)	2.439-2.087
	<i>S. sciuri</i> (2)	2.066-2.035
Tanque de produção	<i>S.aureus</i> (6)	2.503-2.275
	<i>S. equorum</i> (1)	2.319
Mesa de produção	<i>S. haemolyticus</i> (1)	2.218
	<i>S. aureus</i> (1)	2.395
Massa	<i>S. equorum</i> (1)	2.296
	<i>S. sciuri</i> (1)	2.134
	NI ²	
Forma	<i>S. aureus</i> (1)	2.424
	<i>S. intermedius</i> (1)	2.208
	<i>S. sciuri</i> (3)	2.032-2.020
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	2.011
	<i>S. xylosus</i> (1)	2.005
Superfície de maturação	<i>S. sciuri</i> (2)	2.305-2.223
	<i>S. warneri</i> (2)	2.162-2.132
	<i>S. saprophyticus</i> (1)	2.105
	<i>S. equorum</i> (1)	2.075
Queijo colonial	<i>S. equorum</i> (2)	2.321-2.234
	<i>S. haemolyticus</i> (1)	2.124
	<i>S. sciuri</i> (4)	2.082-2.011
Manipulador	<i>S. aureus</i> (1)	2.547
	<i>S. hominis</i> (1)	2.288

1: intervalo do escore obtido pelo método de MALDI-TOF; 2: NI: sem isolamento.

A produção de queijo colonial prevê manipulação excessiva, sendo passíveis de contaminação especialmente de origem microbiológica. Os manipuladores de alimentos são as fontes de contaminação mais frequentes. Aproximadamente 40% das pessoas sadias, essa bactéria é encontrada colonizando as mucosas da nasorofaringe e feridas infectadas. Ainda, a utilização de uniformes, gorro, máscara e luvas não é uma prática comum na maioria das agroindústrias, incluindo uma das agroindústrias pesquisadas neste trabalho. Este fato reflete a importância dos programas de capacitação e comprova que os processos de higiene é um dos fatores de maior relevância para controle de qualidade e inocuidade do queijo colonial (SANTOS et al., 2007; PINTO et al., 2009; SALES et al., 2015; RONCATTI, 2016).

O *S. intermedius* foi outra espécie de SCP identificada nas agroindústrias, na etapa do leite cru e queijo em maturação. Esta espécie pode ser classificada como patógeno oportunista principalmente em animal. No presente estudo a ocorrência de *S. intermedius* pode também estar relacionada a quadros de mastite com a presença de animais domésticos próximos as instalações de produção do queijo colonial. Em pesquisas relacionando a presença de genes de resistência em *S. aureus* e *S. intermedius*, isolados de mastite bovina, sugere uma possível transmissão interespecífica devido à proximidade do bovino leiteiro e outros animais domésticos (GILLESPIE et al., 2009; HOGVEEN et al., 2011).

Em relação aos isolados SCN destaca-se o *S. warneri* na agroindústria A e *S. sciuri* na agroindústria B. Em estudo realizado por Motta et al. (2014) utilizando a mesma metodologia o *S. sciuri* foi SCN mais isolado em amostras de leite. Em relação a etapa do leite cru é importante controlar a presença de SCN no animal considerando que podem ocasionar infecções persistentes com o aumento da contagem de células somáticas além da diminuição da produção de leite (GILLESPIE et al., 2009). Borges et al. (2008) quando analisaram as etapas de produção do queijo coalho identificaram como espécie predominante na coalhada o *S. caprae* e no queijo *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*.

Algumas espécies de SCN identificadas nesta pesquisa, como *S. xylosum* e *S. equorum* são particularmente importantes na produção de alimentos, sendo responsáveis pela formação do aroma e a estabilização da cor em salsichas, salames e queijos podendo ser utilizadas com segurança como culturas iniciadoras nos processos de fermentação (JANSSENS et al., 2013).

5.4 Amplificação de Fragmentos de Genes Produtores de Enterotoxinas Estafilocócicas (se)

Dos 72 isolados de *Staphylococcus* sp. testados, em 4% (3/72) foram detectados somente os genes *sea* e/ou *seb*. Os fragmentos de genes envolvidos na síntese de *sec*, *sed* e *see* não foram amplificados em nenhum dos 72 isolados.

No isolado de SCP identificado com *S. aureus* da amostra de leite cru pertencente à agroindústria B foi evidenciado dois genes concomitante: *sea* + *seb* (Figuras 2 e 3, respectivamente). Outros estudos demonstram a baixa ocorrência de

Staphylococcus sp. enterotoxigênico em leite cru atribuindo estes resultados a alta variabilidade genética entre isolados (CENCI-GOCA et al., 2003; ZOCCHER et al., 2010).



Figura 2: Produtos da amplificação por PCR para o gene *sea* em isolados de SCP e SCN das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do RS¹.

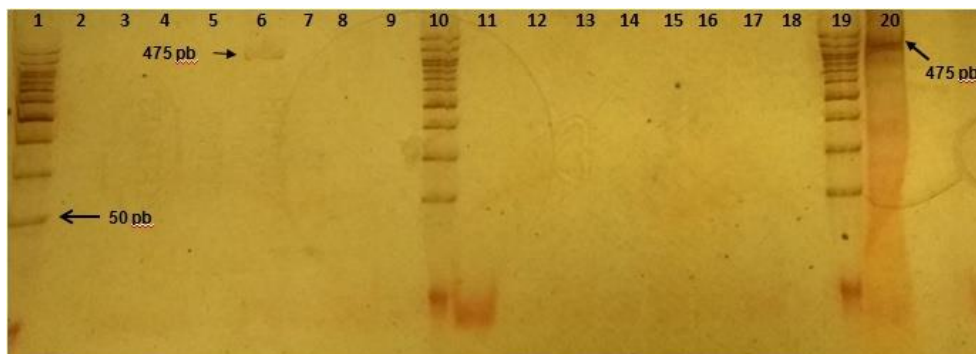


Figura 3: Produtos da amplificação por PCR para o gene *seb* em isolados de SCP e SCN das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do RS².

¹ Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. 1 e 10 – marcador molecular 50 pb (Ludwig®); 2 – isolado 102; 3- isolado 104; 4- isolado 112; 5 – isolado 117; 6 – isolado 119; 7 – isolado 133; 8- isolado 139; 9 – controle negativo (reação de PCR sem DNA); 11- isolado 146; 12- isolado 148; 13- isolado 151; 14 – isolado 153; 15- isolado 157; 16- isolado 163; 17– isolado 92; 18– isolado 24; 19- *S.aureus* produtor de *sea* ATCC13565.

² Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. 1 e 10 – marcador molecular 50 pb (Ludwig®); 2 – isolado 102; 3- isolado 104; 4- isolado 112; 5 – isolado 117; 6 – isolado 119; 7 – isolado 133; 8- isolado 139; 9 – controle negativo (reação de PCR sem DNA); 10- marcador molecular 50 pb (Ludwig®); 11- isolado 146; 12- isolado 148; 13- isolado 151; 14 – isolado 153; 15- isolado 157; 16- isolado 163; 17– isolado 92; 18– isolado 44; 19- marcador molecular 50 pb (Ludwig®); 20- *S.aureus* produtor de *seb* ATCC 14458.

A bactéria foi isolada de amostra pertencente a agroindústria B e tratandose de leite cru, passou pelo tratamento térmico de pasteurização. Porém, embora os tratamentos térmicos comumente utilizados em laticínios assegurem a destruição da maioria das células vegetativas, estes não são suficientes para inativar enterotoxinas SE (ICMSF, 2015). Quando relacionado o isolado de *S. aureus sea+* e *seb+* com a quantificação de SCP da amostra, esta apresentou $2,48 \log_{10} \text{ UFC/mL}^{-1}$.

Os outros *S. aureus* que tiveram a confirmação da presença do gene *sea* foram isolados de queijo colonial da agroindústria A (Figura 4). Estes queijos apresentaram contagens de SCP de $2 \log_{10} \text{ UFC/g}^{-1}$ e $2,3 \log_{10} \text{ UFC/g}^{-1}$, respectivamente. É necessária uma população entre $4 \log_{10} \text{ UFC/g}^{-1}$ a $5 \log_{10} \text{ UFC/g}^{-1}$ para que os estafilococos sejam capazes de produzir SEs. As SEs são sintetizadas na fase logarítmica ou durante a transição entre a fase estacionária (ARGUDIN et al., 2010; PAULI et al., 2012).

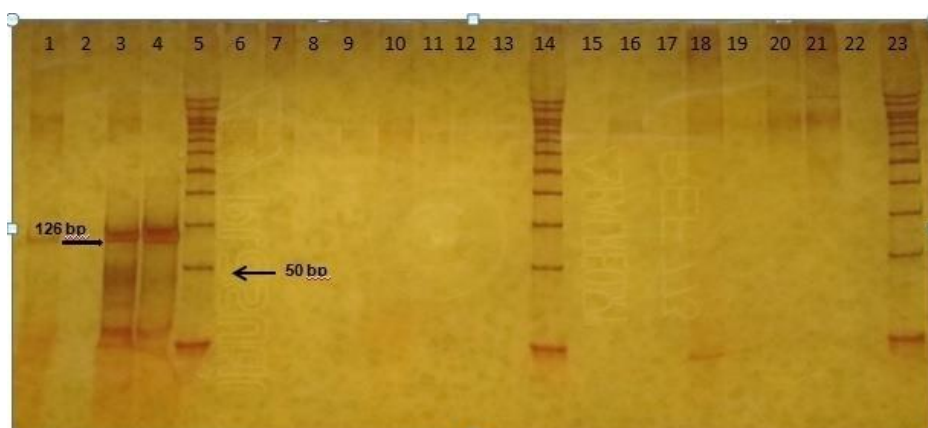


Figura 4: Produtos da amplificação por PCR para o gene *sea* em isolados de SCP e SCN das etapas de produção, superfícies de produção e dos manipuladores de duas agroindústrias produtoras de queijo colonial do RS³.

A maioria das informações existentes quanto à determinação de toxinas em alimentos são referentes a *S. aureus*. Esses dados revelam que dentre as SEs, a

³ Gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. 1 – *S. aureus* produtor de *sea* ATCC 13565; 2, 15 e 22 - controle negativo (reação de PCR sem DNA); 3 – isolado 204; 4- isolado 206; 5, 14, 23 - marcador molecular 50 pb (Ludwig®); 6 – isolado 164; 7- isolado 165; 8 - isolado 170; 9 – isolado 176; 10 – isolado 177; 11 – isolado 183; 12- isolado 133; 13- isolado 188; 16- isolado 190; 17- isolado 191; 17 – isolado 193; 18- isolado 89; 19- isolado 59; 20– isolado 73; 21- isolado 44.

enterotoxina A é a mais frequentemente relacionada a casos de surtos de intoxicação alimentar seguida por SED, SEC e SEB e raramente SEE (CHAVES, 2016; ROLA et al., 2016).

Utilizando os mesmos oligonucleotídeos desta pesquisa, Moura et al. (2012), identificou os genes para produção de SE em isolados de SCP e SCN em 40% dos isolados, os mais frequentes, foram *sea* e *seb*. Zocche et al. (2012), apresentou resultado semelhante porém em PCR desenvolvida a partir da extração de DNA direta do queijo. No entanto, nos SCP e SCN testados por Borelli et al. (2011) em isolados de queijo minas, não houve a identificação de genes que codificam para SE.

O leite e produtos lácteos têm sido associados com frequência a casos esporádicos de intoxicação estafilocócica. Relatos de ocorrência de cepas coagulase negativa, com potencial enterotoxigênico indicam a necessidade de reavaliação dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos. Tais padrões correlacionam a produção da enzima coagulase com a capacidade de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* sp. Neste trabalho nenhum SCN apresentou o gene para as enterotoxinas pesquisadas.

A presença de SCP e SCN nas etapas e superfícies de produção nas agroindústrias pesquisadas, indica a possível contaminação pós processamento, tornando-se evidente a necessidade desenvolver estratégias efetivas para minimizar a presença deste e outros microrganismos dentro do ambiente de processamento de queijo colonial, como a implantação das BPF. Assim, o consumo de queijo colonial deve ser motivo de preocupação para as autoridades da região onde foram produzidos devido ao nível de contaminação por agentes patogênicos, representando risco à saúde dos consumidores.

6. CONCLUSÃO

As agroindústrias de queijo colonial analisadas neste trabalho apresentaram baixo percentual de conformidades quanto aos itens das BPF previstas pela legislação vigente, atendendo menos de 50% dos itens exigidos.

As amostras analisadas de queijo colonial, classificados como alta umidade, apresentaram-se dentro dos padrões da legislação nas análises de estafilococos coagulase positiva, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. No entanto, em média 30% das amostras analisadas apresentaram valor de coliformes 45°C acima dos padrões mínimos exigidos sendo, portanto, reprovadas.

Quando analisado a evolução dos bioindicadores nas etapas de produção do queijo colonial, com exceção da *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp., apresentaram-se com um média semelhante em todas as etapas demonstrando um efeito pouco expressivo, nestas amostras, da salga e maturação.

Foi possível a indentificação e isolamento de *Staphylococcus* sp. em todas as etapas e superfícies pesquisadas destacando o *S. aureus* como o principal SCP e o *S.warneri* e *S.sciuri* dos SCN.

Foram identificados genes *sea* e *seb* em *S.aureus*, isolados de amostras de leite cru e queijo colonial. Neste trabalho nenhum SCN apresentou o gene para as enterotoxinas pesquisadas.

Portanto, o trabalho demonstra a necessidade de padronização do queijo colonial e implantação de BPF de forma eficaz nas agroindústrias produtoras de queijo colonial.

7. REFERÊNCIAS

- Abrahão WM, Abrahão PRS, Monteiro CLB, Pontarolo R. 2008. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Rev Bras Ciênc Farmac.** 44: 289-96.
- Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. 2006. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. *Lett in Applied Microbiology.* 43: 450–454.
- Allerberger F, Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology Infect.* 16: 16-23.
- Amorim, ALBC. 2014. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Rev.Inst. Adolfo Lutz.** São Paulo. 73 (4): 364-367.
- Angeletti S. 2016. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods.** 138: 20–29.
- Antonello L, Kupkovski A, Bravo CC. 2012. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. **Rev. Thema.** 9 (1): 01–06.
- APHA. (American Public Health Association). (2005). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 5.ed. Washington.
- Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Toxins.* 2(7): 1751-1774.
- Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology.** 61 (1): 1-10.
- Becker K, Heilmann C, Peters G. 2014. Coagulase-negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews.** 27 (4). 870-926.
- Blaiotta G, Fusco V., Ercolini D, Pepe O, Coppola S. 2010. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology.** 48 (1): 192-201.

- Bonjara N, Sutric MJ, Hallen-Adans HE. 2015. Diversity et yeast and mold species frama variety of cheese types. *Curr Microbiol.* 70:792-800.
- Bonofh B, Wasem A, Traoré AN, Fané A, Spillmann H, Simbé CF, Alfaroukh O, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J. 2003. Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udd to selling point in Bamako (Mali). *Food Control.* 14 (7), 495-500.
- Borelli BM, Lacerda ICA, Brandão LC, Vianna CR, Ferreira MC, Gomes FCO. 2011. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 63 (2); 481-487.
- Borges MF, Nassu RT, Pereira JL, Andrade AP, Kuaye AY. 2008. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção do queijo coalho. **Ciência Rural.** 38 (5): 1431-1438.
- Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. 2007. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 59(6):1570-4.
- BRASIL. 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento técnico geral para fixação de requisitos microbiológicos de queijos. Disponível em: <<https://inspleite/files/2016/03/Portaria-n%C2%B0-146-de-7-de-mar%C3%A7o-de-1996.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2016.
- _____. 1998. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. Portaria nº 46, 10/02/1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, seção I, p. 24, 13 março 1998. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-dipoa-10-de-22-05-2003,744.html>>. Acesso em: 12 mai. 2016.
- _____. 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 11 abr. 2014.
- _____. 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC N° 275/ 02. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. In: *Diário Oficial da União*, Brasília, 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254>. Acesso em: 10 abr. 2014.

- _____. 2003a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em : <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-62-de-26-de-agosto-de-2003-1.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2015.
- _____. 2003b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institui o Programa Genérico de Procedimentos – Padrão de Higiene Operacional – PPHO, a ser utilizado nos estabelecimentos de leite e derivados que funcione sob o regime de inspeção federal, como etapa preliminar e essencial dos programas de segurança alimentar do tipo APPCC. Resolução n. 10, de 22 de maio de 2003. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-dipoa-10-de-22-05-2003,744.html>>. Acesso em: 8 abr. 2015.
- _____. 2011a. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº74, de 16 de dezembro de 2011. Estabelece critérios para maturação de queijos artesanais com período de maturação inferior a 60 dias. Disponível em: <https://members.wto.org/crnattachments/2012/sps/BRA/12_0031_00_x.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2014.
- _____. 2011b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Disponível em: <<https://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2015.
- _____. 2011c. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa N°57, de 15 de dezembro de 2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, Seção I, 16 de dezembro de 2011.p. 23. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html>>. Acesso em: 15 ago. 2016.
- _____. 2017. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

- Brito MAVP, Campos GMM, Brito JRF. 2002. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**. 32 (1): 79-82.
- Carrascosa C, Millán R, Saavedra P, Jaber JR, Raposo A, Sanjuán E. 2016. Identification of risk factors associated with cheese production to implement the HACCP system on cheese farms. *J. Dairy Sci.* 99: 2606-2616.
- Cartwright E, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Malon BF. 2013. **Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles**, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23260661>>. Acesso em: 15 jun. 2018.
- Carvalho JDG, Viotto WH, Kuaye AY. 2007. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. 18 (3): 262-267.
- Cenci-Goga BT, 2003. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**. 66, 1693-1696.
- Ceugniz A, Drider D, Jacques P, Coucheney F. 2015. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*. 52: 177-184.
- Chaves TF. 2016. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Ciência Equatorial**. Macapá, 2 (1):14 p.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 48(4):1169-1175.
- Clark A, Kaleta E, Arora A, Wolk D. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin. Microbiol. Rev.** 26(3):547-603.
- Coelho KO, Mesquita AJ, Machado PF, Lage ME, Meyer PM, Reis AP. 2014. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(4): 1260-1268.
- Contreras GA, Rodríguez JM. 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**. 16(4): 339-356.
- Costa JCB, Freitas AEI, Lemos AA, Medeiros VM, Warnken NHT, Miyazaki VA. 2012. Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxigenic genes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 71: 250-258.

- Costa JNP, Santos VVM, Silva GR, Moura FML, Gurgel CAB, Moura APBL. 2013. Condições higiênico-sanitárias e físico-estruturais da área de manipulação de carne *in natura* em minimercados de Recife (PE), Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 80 (3): 352-358.
- Costa RGB, Lobato V, Abreu LR, Magalhães FAR. 2004. Salga de queijos em salmoura: uma revisão. **Rev. Inst. Latic.** “Cândido Tostes”. 59: 41-49.
- Dantas DS, Araújo AM, Santos JO, Santos RMS, Rodrigues OG. 2013. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. *Agropecuária Científica no Semiárido.* 9: 110-118.
- Doyele MP, Beuchat LR. 2007. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** Disponível em: <<https://lib.ugent.be/catalog/rug01:002251242>>. 3.ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1038 p.
- Downes FP, Ito K. 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association. 3: 25-35.
- Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin. Lab.* 55(7/8): 289-296.
- EMATER/RS. **Queijo Colonial terá qualidade regulamentada.** Porto Alegre, 2016. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/noticias/detalhenoticia.php?id=24267#.WfR2DFtSzIV>> Acesso em: 05 nov. 2017.
- Euzéby JPM. 2018. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN).** Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr>>. France. Acesso em: 12 jun. 2018.
- Feitosa T, Borges MF, Nassu RT, Azevedo EHF, Muniz CR. 2003. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp., e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 23: 162-165.
- Fernandes R. 2009. **Microbiology handbook dairy products.** Leatherhead Publishing, Cambridge. 3.ed. 320p.
- Feix RD, Leusin SJ, Agranonik C. 2016. **Painel do Agronegócio no Rio Grande do Sul- 2016. Fundação de Economia e Estatística.** Centro de Estudos Econômicos e Sociais. Núcleo de Estudos do Agronegócio. Porto Alegre: FEE. Disponível em: <<https://www.fee.rs.gov.br/wpcontent/uploads/2016/09/20160927relatorio-painel-do-agronegocio-no-rs-2016.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2108.

- Fijalkowski K, Peitler D, Jolanta K. 2016. Staphylococci isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. **International Journal of Food Microbiology**. 238: 113–120.
- Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, Mcsweene PLH. 2000. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg Aspen Publishers. 588 p.
- Galinari E, Nóbrega JE, Andrade NJ. 2014. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. *Braz J Microbiol*. 45:713-720.
- Galvani JWC, Azevedo DL. 2013. Avaliação das características de queijos tipo colônia produzidos em estabelecimentos com inspeção estadual no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE DEFESA AGROPECUÁRIA, IV, 2013, Belém. Resumos. Departamento de Defesa Agropecuária, Pará.
- Gillespie BE, Headrick SI, Boonyayatra S, Oliver SP. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol*. 134 (1): 65-72.
- Gleeson D, O'Connell A, Jordan K. 2013. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank Milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**. 52: 217–227.
- Gusso AP. 2009. Salga de queijos. **Anais do I Endict - Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Hassanzadeh S, Pormand MR, Afshar D, Dehbashi S, Mashhadi R. 2016. A Rapid DNA Extraction Method of *Staphylococcus aureus*. **Iran J Public Health**. 45(8) : 1093-1095.
- Hennekinne JA, Buyser ML, Dragacci S. 2012. **Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins**: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 36: 815–836.
- Hocking AD, Faedo M. 2008. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged cheddar cheese during maturation. **International Journal of Food Microbiology**. 16: 126-130.
- Hofer E, Reis CMF, Hofer CB. 2006. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Rev Soc Bras Med Tropical**. 39: 32-7.
- Hogeveen H, Huijps K, Lam TJGM. 2011. Economic aspects of mastitis: new developments. **N.Z. Vet. J**. 59(1):16-23.

- Hsieh SY, Tseng CL, Lee YS, Kuo AJ, Sun CF, Lin YH, Chen JK. 2008. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics*. 7(2):448-456.
- Hwang SM, Kim MS, Park KU, Song J, Kim EC. 2011. *tuf* gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. 49 (12): 4142- 4149.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2006. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf>. Acesso em: 22 out. 2017.
- ICMSF. 2015. **Microrganismos em alimentos**. 8.ed. Blucher Ltda.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11290-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Enumeration Method. International Standard. Geneva. Switzerland, 1996.
- Jahn RC, Garcia MV, Copetti MV. 2017. Deterioração fúngica em indústria de queijo tipo tropical. **Brazilian Journal of Food Research**. 8 (1):16-25.
- Janssens M, Myter N, Vuyt DE, Leroy F. 2013. Community dynamics of coagulase-negative staphylococci during spontaneous artisan-type meat fermentations differ between smoking and moulding treatments. **International Journal of Food Microbiology**. 166 (1): 168–175.
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. 2014. ***Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease**: an ongoing challenge in public health. Biomed Research International, New York, Disponível em : <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804250>>. Acesso em: 10 mar. 2018.
- Koelln FTS, Mattana A, Hermes E. 2009. Avaliação microbiológica do queijo tipo mussarela e queijo colonial comercializado na região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. 3 (2): 66-74.
- Kürekci, C. 2016. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**. Lancaster. 99 (4): 2675–2679.
- Lavoie K, Touchette M, ST-Gelais D, Labrie S. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. & Technol*. 92:455–468.

- Leite Junior, AFS; Torrano ADM, Gelli DS. 2000. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**. 14 (74): 45-49.
- Mac Faddin, JF. 2001. **Biochemical testes for identification of medical bacteria**. 3 ed. Baltimore: Willians & Wilkins. 652p.
- Martins JM, Galinari É, Natan J, Pimentel F, Ribeiro Jr, Furtado MM, Ferreira CLLF. 2015. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. 46 (1): 219-230.
- Mazzariol A, Cascio G, Kocsis E, Maccacaro L, Fontana R, Cornaglia G. 2012. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 31 (4): 523-527.
- Melo FD, Dalmina KA, Pereira MN, Ramella MV, Neto AT, Vaz EK, Ferraz SM. 2013. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico química e o período de maturação. *Acta Scientiae Veterinariae*. 41 (1152): 01-07.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2016. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta_o_Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em: 2 mai. 2018.
- Mior LC. 2014. Inovações organizacionais da agricultura familiar: as agroindústrias e cooperativas descentralizadas no sul catarinense. In: CONGRESSO SOBER – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 52, 2014, Goiânia. **Anais...Goiânia, GO: SOBER, 2014. 1-20.**
- Morais VMF. 2005. **Identificação de fungos leveduriformes e filamentosos em queijos de manteiga**. 70 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Motta CC, Coelho AC, Rojas M, Dubenczuk FC, Botelho LAB, Moreira BM, Coelho SM, Coelho IS, Moreira M. 2014. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization, time-offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. **African Journal of Microbiology Research**. 8 (48): 3861-3866.
- Moura TM, Campos FS, Azevedo PA, Van Der Sand S T, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2012. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from Black pudding. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 45(5):579-585.

- Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:796-802.
- Necidová L, Štásková Z, Posp Šilová M, Janštová B, Strejček JAN, Dušková M, Karp ŠR. 2009. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Sciences**. 27:127-133.
- Neto LGG, Souza MR, Nunes AC, Nicoli JR, Santos WLM. 2005. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57 (2), 245-250
- Neves E, Silva AC, Roche SM, Velge P, Brito L. 2008. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. **Journal of Medical Microbiology**. 57: 411–415.
- Nguyen DT, Van Hoorde K, Cnockaert M, De Brandt E. 2012. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Lett Appl Microbiol*, 55: 265-73.
- Nunes RSC, Aguila EMD, Paschoalin VMF. 2015. Safety evaluation of the coagulase negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *Biomed. Res. Int.* Artigo: 483548. <http://doi.org/10.1155/2015/483547>.
- Okura MH, Araujo PF, Jardim FBB, Silva RR, Finzer JRD, Franzé SJ. 2006. Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo Minas Frescal. **Revista Higiene Alimentar**. v.20, n.143, p.84-91.
- Olalde AR. 2017. **Agricultura Familiar e Desenvolvimento sustentável**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo3.htm>>. Acesso: 12 nov. 2017.
- Oliveira DF. 2012. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64 (2): 521-523.
- Oliveira JM, Magrize IZO. 2014. Avaliação das condições higiênico-sanitário dos restaurantes de Porto Rico – PR. **Revista Uningá**. 42: 54-58.
- Ortolani MBT, Yamazi AK, Moraes PM. 2010. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. *Foodborne Path. and Disease*. 7(2)175-80.

- Oxaran V, Lee SHI, Chaul LT, Corassin CH, Barancelli GV, Alves VF, Oliveira CAF, Gram L, Martinis ECP. 2017. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiology*, 68, 16-23.
- Panda A, Kurapati S, Samantaray JC, Srinivasan A, Khalil S. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. **Indian J. Med. Res.** 140:770-777.
- Patel R., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin. Infect. Dis.* 57, 564–572.
- Paula JCJ, Carvalho AF, Furtado MM. 2009. Basic principles of cheese production: from historical to salting. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”** 367/368, (64): 19-25,
- Paulin S, Horn B, Hudson JA. 2012. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products: MPI Technical – chose one paper No: 2012/07 Prepared for the Ministry for Primary Industries. New Zealand. 83p.
- Peixoto JPN, Furtado DA, Oliveira CJB, Gomes JP. 2012. Qualidade do ambiente e níveis de contaminação por micro-organismos em queijarias, no Agreste Paraibano. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.** 14 (2): 177-183.
- Pereira BP, Vieira TR, Valent JZ, Bruzza A, Araújo S, Pinto AT, Schmidt V. 2014. **Implications of the quality of the production process artisan cheese serrano.** *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria.* v.18, p.116-126, 2014. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/13183/pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2015.
- Piette A, Verschraegen G. 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology.** 134: 45–54.
- Pinto MS, Ferreira CLLF, Martins JM, Teodoro VAM, Pires ACS, Fontes LBA, Vargas PIR. 2009. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. *Pesq. Agropec. Trop.* 39 (4): 342-347.
- Rall VL, Sforcin JM, Deus MF, Souza DC, Camargo CH, Godinho NC, Galindo LA, Soares TC, Araújo JP. 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxigenic genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian minas cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*, Larchmont, 7 (9): 1121-1123.
- Ries JE. 2012. Projeto de qualificação e certificação do queijo serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul - relato parcial da experiência. *Agroecologia e Desenv. Rural Sustentável*, Porto Alegre, 5 (1):10-19.

- _____. JE. 2017. **Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul. Emater/RS** – Ascar. Porto Alegre.
- RIO GRANDE DO SUL. 2013. **Secretaria de Desenvolvimento Rural Pesca e Cooperativismo. Agroindústrias cadastradas no Programa Estadual de Agroindústria Familiar**. Porto Alegre. Disponível em : <<http://www.sdr.rs.gov.br/programa-estadual-de-agricultura-familiar>>. Acesso em: 11 mar. 2018.
- Rola JG, Korpysa-Dzorbaw W, Czeibkowska A, Osek J. 2016. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. **Journal of Dairy Science**. Lancaster, 98 (7): 4273-4278.
- Roncatti R. 2016. **Desenvolvimento e caracterização do queijo Santo Giorno, típico do sudoeste do Paraná, produzido com leite cru e fermento endógeno**. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco.
- Rossi CF. 2006. **Condições higiênico-sanitárias de restaurantes do tipo self-service de Belo Horizonte – MG**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Ruaro A, Andrighetto C, Torriani S, Lombardi A. 2013. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiology*, 34 (1): 106-111.
- Sales GA, Watanabe M, Gianezini M. 2015. Agroindústria rural de pequeno porte: estudo de caso do queijo minas artesanal. *Engenharia Ambiental*, 12 (1), 41-52.
- Sangaletti N, Porto E, Brazaca SGC, Yagasaki CA, Dalla DEA, SILVA M. 2009. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. 29 (2), 262-269.
- Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira ABLA, Afonso I, Rodrigues CR, Castro HC. 2007. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **J Bras Patol Med Lab**. 43 (6): 413-423.
- Santos CG, Naves EAA, Paiva AD, Vianna PCB, Toli FT. 2007. Condições higiênico-sanitárias na produção de queijo artesanal produzido em Uberaba – MG. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, 72 (2):96-107.
- Schleifer KH, Bell JA. 2009. Family VIII. *Staphylococcaceae*. In: DE VOS P. et al. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th ed. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, (3):1445 p.

- Seixas VNC, Felix MR, Silva GM, Perronell IT, Carvalho AF. 2015. Caracterização do queijo do Marajó tipo manteiga produzido em duas estações do ano. **Ciência Rural**. 45 (4), 730-736.
- Seeliger HPR, Hohne K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergant T, Morris JR. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press: 330-348.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, 2009. Ongoing revolution in bacteriology: outline identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 49: 543-51.
- Silva AS; Aragond CC, Walter EH, Destroc MT, Costa M, Alegroa LCA. 2011. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **Cient Ciênc Biol Saúde**.13(1):59-67.
- Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. 2006. Avaliação do padrão coliformes 45°C e eficiência com técnica dos tubos múltiplos e Petrifil EC na detecção de coliformes totais e *E.coli* em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26 (2): 352-359.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA; Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. 2010. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. 4 ed. Varela, São Paulo, 624 p.
- Silveira Jr JF. 2012. Caracterização físico-química de queijos coloniais produzidos em diferentes épocas do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 386, n. 46, p. 67–80.
- Soares KDA, Ramalho AC, Salgado SM, Livera AVS, Mota RA, Lemsaddek TS, Medeiros ES. 2013. Microbiological and physicochemical quality of curd cheese sold in the state Alagoas (BRAZIL). *Boletim do Centro de Pesquisas de Processamentos de Alimentos*.31(1):51- 56.
- Tesser IC, Farinã LO, Kottwitz LBM, Sosa DEF, Pramiu DC. 2016. Fabricação artesanal de queijo colonial analisada sob critérios da IN 30/2013. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, 71 (4): 206-218.
- Tomich RGP, Tomich TR, Amaral CAA. 2005. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústria de pão de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 25 (1): 115-120.
- Tondo EC, Ritter AC, Casarin LS. 2015. Involvement in foodborne outbreaks, risk factors and options to control *Salmonella Enteritidis* SE86: an important food pathogen in Southern Brazil. In: Christopher B. Hackett. (Org.). **Salmonella**. 1ed. New York, NY: Nova Science Publishers, p. 65-77.

Tood ECE; Notermans S. 2011. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen *L. monocytogenes*. *Food Control*, 22: 1484-1490.

Torkar KG; Vengust A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*. 19 (5):570-577.

Ünal N, Çinar OD. 2012. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, 44 (2): 369-375.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. Cap. 4. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2016.

Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Santos DA, Cerqueira MM, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. 12: 410-415.

Vinha MB, Pinto CLO, Souza MRM, Chaves JBP. 2010. Fatores socioeconômicos da produção de queijo minas frescal em agroindústrias familiares de Viçosa, MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, 40, 2023-2029.

Yeni F, Yavaş S, Alpas H, Soyer Y. 2016. Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56:9, 1532-1544, DOI: 10.1080/10408398.2013.77702.

Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel T, Gotz F. 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 246-251.

Zocche F, Silva WP. 2010. PCR **Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. INCL, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2010.

Zocche F, Silva WP. 2012. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alim. Nutr.** Araraquara, v.23, n. 2, p. 187-193, 2012.

Wadamori Y, Gooneratne R, Hussain MA. 2017. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. **J Sci Food Agric**. 97: 1396–1403

Wang X, Tao X, Xia X. 2013. *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken in China. Food Control, 29: 103-106.

8. APÊNDICES

APÊNDICE I

AUTORIZAÇÃO PARA EXECUÇÃO DE PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

(PPGMAA)

À Agroindústria:

Endereço:

O controle da qualidade higiênico-sanitária tem recebido muita atenção em pesquisas e debates, na área da saúde, por ser um item de fundamental influência na disseminação de doenças transmitidas por alimentos. O uso das boas práticas de manipulação configura procedimento operacional necessário para garantir a qualidade dos alimentos produzidos, pois utiliza princípios básicos de higiene. Além disso, é necessário ter certeza de que as técnicas higiênicas utilizadas na produção dos queijos artesanais dentro da indústria estão sendo suficientes para minimizar ao máximo a microbiota patogênica da linha de produção. Utilizam-se técnicas de microbiologia clássica e molecular para fazer rastreamento dos possíveis patógenos que por ventura ainda permaneçam na linha de produção e no produto acabado, mesmo com procedimentos de controle de higiene instalados. Os alimentos, bem como seus manipuladores, podem ser veículos de disseminação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Para o controle da qualidade higiênico-sanitária na produção de queijos e alimentos em geral, as indústrias precisam fazer uso de algumas ferramentas de auxílio como as boas práticas. O uso desta ferramenta configura procedimento operacional necessário para garantir a qualidade dos alimentos produzidos, pois utiliza princípios básicos de higiene.

A aluna de doutorado acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Cristina Bergman Zaffari Grecelle, vem por meio desta solicitar a Vossa Senhoria a autorização e inclusão do na realização da pesquisa intitulada: **“Avaliação higiênico-sanitária e identificação**

genotípica do *Staphylococcus* sp. no processamento do queijo colonial produzido em agroindústrias familiares do Rio Grande do Sul - Brasil.”

A pesquisa se realizará nas estruturas da agroindústria mediante a autorização por escrita.

Para coleta de amostras será realizada uma visita por mês, durante 12 meses. A pesquisadora, e um auxiliar irão preencher uma lista de verificação de Boas Práticas, com itens baseados pela RDC N° 275 de 21 de Outubro de 2002 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Para análises microbiológicas serão coletados materiais de equipamentos e amostras das seguintes etapas: 200 mL de leite cru, 200 gramas de coalhada, 200 gramas de massa após a salga, 01 unidade do produto acabado. Serão coletadas amostras através de suabes das mãos dos manipuladores. Os manipuladores de alimentos serão convidados a participar da pesquisa e somente serão inclusos mediante assinatura de um termo de consentimento informado. O nome da agroindústria e de todos os funcionários que participarão da pesquisa será mantido em sigilo absoluto.

Após a conclusão da pesquisa, todos os resultados serão repassados para a agroindústria na forma de relatório, apresentação em forma de seminário, além de orientações quanto a possíveis não conformidades detectadas, sugerindo ações corretivas na intenção de promover práticas saudáveis de higiene na manipulação e produção do queijo colonial.

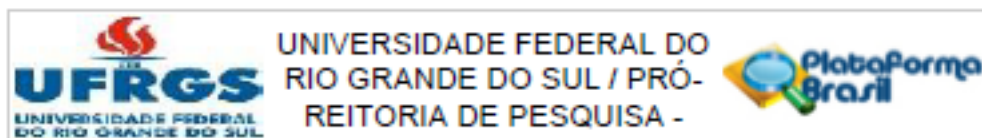
Cristina Bergman Zaffari Grecelle
Aluna Doutoranda do PPGMAA-UFRGS

Profa. Dra. Maris da Costa
Professora - Orientadora da Pesquisa /UFRGS

Assinatura/ CPF do proprietário

APÊNDICE II

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DO *Staphylococcus* sp. NO PROCESSAMENTO DO QUEIJO COLONIAL PRODUZIDO EM AGROINDÚSTRIAS FAMILIARES DO RIO GRANDE DO SUL - BRASIL

Pesquisador: Marisa da Costa

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 32369514.2.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA/RS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 779.163

Data da Relatoria: 28/08/2014

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as condições higiênicas-sanitárias e classificar fenotipicamente e genotipicamente cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas durante o processamento do queijo colonial produzido pela agricultura familiar do Rio Grande do Sul.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado na nova versão, conforme solicitado pelo CEP UFRGS.

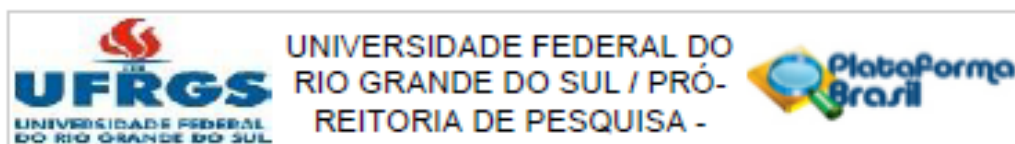
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As informações foram atualizadas no formulário da Plataforma Brasil e agora estão de acordo com o projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores atenderam a solicitação e a versão atualizada do TCLE foi anexada à documentação do projeto de pesquisa.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Ferrouilha **CEP:** 91.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 779.163

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 04 de Setembro de 2014

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Ferrouilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

APÊNDICE III

Resultado obtidos nas Listas de Verificações aplicadas na Agroindústria A

CAÇÃO E INSTALAÇÕES					
Item avaliado	Sim	Não	N.A	% DE ADEQUAÇÃO	
1.1 ÁREA EXTERNA:				0,00%	
1.1.1		1			
1.1.2		1			
1.2 ACESSO:				0,00%	
1.2.1		1			
1.3 ÁREA INTERNA:				0,00%	
1.3.1		1			
1.4 PISO:				0,00%	
1.4.1		1			
1.4.2		1			
1.4.3		1			
1.5 TETOS:				50,00%	
1.5.1	1				
1.5.2		1			
1.6 PAREDES E DIVISÓRIAS:				33,33%	
1.6.1	1				
1.6.2		1			
1.6.3		1			
1.7 PORTAS:				0,00%	
1.7.1		1			
1.7.2		1			
1.7.3		1			
1.8 JANELAS E OUTRAS ABERTURAS				100,00%	
1.8.1	1				
1.8.2	1				
1.8.3	1				
1.9 ESCADAS, ELEVADORES DE SERVIÇO, MONTACARGAS E ESTRUTURAS AUXILIARES				#DIV/0!	
1.9.1			1		
1.9.2			1		
1.10 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS E VESTIÁRIOS PARA OS MANIPULADORES:				66,67%	
1.10.1		1			
1.10.2		1			
1.10.3		1			
1.10.4	1				
1.10.5	1				
1.10.6		1			

1.10.7	1				
1.10.8	1				
1.10.9	1				
1.10.10	1				
1.10.11	1				
1.10.12	1				
1.10.13	1				
1.10.14		1			
1.10.15	1				
1.11 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS PARA VISITANTES E OUTROS:				100,00%	
1.11.1	1			0	
1.12 LAVATÓRIOS NA ÁREA DE PRODUÇÃO: . . .				50,00%	
1.12.1		1			
1.12.2	1				
1.13 ILUMINAÇÃO E INSTALAÇÃO ELÉTRICA:				66,67%	
1.13.1	1				
1.13.2	1				
1.13.3		1			
1.14 VENTILAÇÃO E CLIMATIZAÇÃO				100,00%	
1.14.1	1				
1.14.2				1	
1.14.3				1	
1.14.4				1	
1.14.5				1	
1.14.6				1	
1.14.7				1	
1.15 HIGIENIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES				77,78%	
1.15.1		1			
1.15.2	1				
1.15.3	1				
1.15.4	1				
1.15.5	1				
1.15.6		1			
1.15.7	1				
1.15.8	1				
1.15.9	1				
1.16 CONTROLE INTEGRADO DE VETORES E PRAGAS URBANAS:				66,67%	
1.16.1	1				
1.16.2	1				
1.16.3		1			
1.17 ABASTECIMENTO DE ÁGUA:				58,33%	
1.17.1	1				

1.17.2	1				
1.17.3	1				
1.17.4		1			
1.17.5		1			
1.17.6		1			
1.17.7	1				
1.17.8		1			
1.17.9	1				
1.17.10		1			
1.17.11	1				
1.17.12			1		
1.17.13	1				
1.18 MANEJO DOS RESÍDUOS:.					100,00%
1.18.1	1				
1.18.2	1				
1.18.3	1				
1.19 ESGOTAMENTO SANITÁRIO					100,00%
1.19.1	1	0	0		
1.20 LEIAUTE:					100,00%
1.20.1	1				
1.20.2	1				
Resumo item 1: Edificação e instalações	42	28	9		60,00%
2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS					
Item avaliado	Sim	Não	N.A		
2.1 EQUIPAMENTOS:					12,50%
2.1.1		1			
2.1.2		1			
2.1.3		1			
2.1.4		1			
2.1.5		1			
2.1.6	1				
2.1.7		1			
2.1.8		1			
2.2 MÓVEIS: (mesas, bancadas, vitrines, estantes)					0,00%
2.2.1		1			
2.2.2		1			
2.3 UTENSÍLIOS:					50,00%
2.3.1		1			
2.3.2	1				
2.4 HIGIENIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, MAQUINÁRIOS, E DOS MÓVEIS E UTENSÍLIOS:					88,89%

2.4.1	1				
2.4.2	1				
2.4.3	1				
2.4.4	1				
2.4.5	1				
2.4.6		1			
2.4.7	1				
2.4.8	1				
2.4.9	1				
Resumo item 2: Higienização	10	11	0	47,62%	
3. MANIPULADORES					
Item avaliado	Sim	Não	N.A		
3.1 VESTUÁRIO:				100,00%	
3.1.1	1				
3.1.2	1				
3.1.3	1				
3.2 HÁBITOS HIGIÊNICOS:				100,00%	
3.2.1	1				
3.2.2	1				
3.2.3	1				
3.3 ESTADO DE SAÚDE:				100,00%	
3.3.1	1				
3.4 PROGRAMA DE CONTROLE DE SAÚDE:				0,00%	
3.4.1		1			
3.4.2		1			
3.5 EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL:				100,00%	
3.5.1	1				
3.6 PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO DOS MANIPULADORES E SUPERVISÃO:				50,00%	
3.6.1		1			
3.6.2	1				
3.6.3	1				
3.6.4		1			
Resumo item 3: Manipuladores	10	4	0	71,43%	
4. PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO					
Item avaliado	Sim	Não	N.A		
4.1 MATÉRIA-PRIMA, INGREDIENTES E EMBALAGENS:				54,55%	
4.1.1	1				
4.1.2	1				
4.1.3		1			
4.1.4	1				

4.1.5		1			
4.1.6		1			
4.1.7		1			
4.1.8	1				
4.1.9		1			
4.1.10	1				
4.1.11	1				
4.2 FLUXO DE PRODUÇÃO:					0,00%
4.2.1		1			
4.2.2		1			
4.2.3			1		
4.2.4		1			
4.3 ROTULAGEM E ARMAZENAMENTO DO PRODUTO-FINAL:					11,11%
4.3.1		1			
4.3.2	1				
4.3.3		1			
4.3.4		1			
4.3.5		1			
4.3.6		1			
4.3.7		1			
4.3.8		1			
4.3.9		1			
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO FINAL:					0,00%
4.4.1		1			
4.4.2		1			
4.4.3		1			
4.4.4		1			
Resumo item 4: Matéria-prima, ingredi..	7	20	1		25,93%
5. DOCUMENTAÇÃO					
Item avaliado	Sim	Não	N.A		
5.1 MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO:					0,00%
5.1.1		1			
5.2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRONIZADOS:					6,25%
5.2.1 Higienização das instalações equipamentos e utensílios					
5.2.1.1		1			
5.2.1.2		1			
5.2.2 Controle de potabilidade da água:					
5.2.2.1	1				
5.2.2.2		1			
5.2.3 Higiene e saúde dos manipuladores:					
5.2.3.1		1			

5.2.3.2		1			
5.2.4 Manejo dos resíduos:					
5.2.4.1		1			
5.2.4.2		1			
5.2.5 Manutenção preventiva e calibração de equipamentos.					
5.2.5.1		1			
5.2.5.2		1			
5.2.6 Controle integrado de vetores e pragas urbanas:					
5.2.6.1		1			
5.2.6.2		1			
5.2.7 Seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens:					
5.2.7.1		1			
5.2.7.2		1			
5.2.8 Programa de recolhimento de alimentos:					
5.2.8.1		1			
5.2.8.2		1			
Resumo item 4: Matéria-prima, ingredi..	1	16	0	5,88%	
Total de itens SIM	70				
Total de itens Não	79				
Total de itens N.A	10	159			
% TOTAL DE ATENDIMENTO À RDC	46,98%				
Item	% de atendimento				
EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES	60,00%				
EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	47,62%				
MANIPULADORES	71,43%				
PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO	25,93%				
DOCUMENTAÇÃO	5,88%				
TOTAL GERAL	46,98%				

Resultado das Listas de Verificações aplicadas na Agroindústria B

. EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES				
Item avaliado	Sim	Não	N.A	% DE ADEQUAÇÃO
1.1 ÁREA EXTERNA:				0,00%
1.1.1		1		
1.1.2		1		
1.2 ACESSO:				0,00%
1.2.1		1		
1.3 ÁREA INTERNA:				0,00%
1.3.1		1		

1.4 PISO:				100,00%
1.4.1	1			
1.4.2	1			
1.4.3	1			
1.5 TETOS:				100,00%
1.5.1	1			
1.5.2	1			
1.6 PAREDES E DIVISÓRIAS:				100,00%
1.6.1	1			
1.6.2	1			
1.6.3	1			
1.7 PORTAS:				100,00%
1.7.1	1			
1.7.2	1			
1.7.3	1			
1.8 JANELAS E OUTRAS ABERTURAS				100,00%
1.8.1	1			
1.8.2	1			
1.8.3	1			
1.9 ESCADAS, ELEVADORES DE SERVIÇO, MONTACARGAS E ESTRUTURAS AUXILIARES				#DIV/0!
1.9.1				
1.9.2				
1.10 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS E VESTIÁRIOS PARA OS MANIPULADORES:				80,00%
1.10.1	1			
1.10.2	1			
1.10.3		1		
1.10.4	1			
1.10.5	1			
1.10.6	1			
1.10.7	1			
1.10.8	1			
1.10.9	1			
1.10.10	1			
1.10.11	1			
1.10.12		1		
1.10.13		1		
1.10.14	1			
1.10.15	1			
1.11 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS PARA VISITANTES E OUTROS:				100,00%
1.11.1	1		0	
1.12 LAVATÓRIOS NA ÁREA DE PRODUÇÃO: . . .				50,00%
1.12.1		1		

1.12.2	1			
1.13 ILUMINAÇÃO E INSTALAÇÃO ELÉTRICA:				100,00%
1.13.1	1			
1.13.2	1			
1.13.3	1			
1.14 VENTILAÇÃO E CLIMATIZAÇÃO				100,00%
1.14.1	1			
1.14.2				1
1.14.3				1
1.14.4				1
1.14.5				1
1.14.6				1
1.14.7				1
1.15 HIGIENIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES				66,67%
1.15.1			1	
1.15.2	1			
1.15.3			1	
1.15.4	1			
1.15.5	1			
1.15.6	1			
1.15.7			1	
1.15.8	1			
1.15.9	1			
1.16 CONTROLE INTEGRADO DE VETORES E PRAGAS URBANAS:				66,67%
1.16.1	1			
1.16.2	1			
1.16.3			1	
1.17 ABASTECIMENTO DE ÁGUA:				40,00%
1.17.1	1			
1.17.2				1
1.17.3				1
1.17.4				1
1.17.5				1
1.17.6				1
1.17.7	1			
1.17.8				1
1.17.9			1	
1.17.10			1	
1.17.11			1	
1.17.12				1
1.17.13				1
1.18 MANEJO DOS RESÍDUOS:.				66,67%

1.18.1	1			
1.18.2	1			
1.18.3		1		
1.19 ESGOTAMENTO SANITÁRIO				100,00%
1.19.1	1	0	0	
1.20 LEIAUTE:				100,00%
1.20.1	1			
1.20.2	1			
Resumo item 1: Edificação e instalações	47	16	14	74,60%
2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS				
Item avaliado	Sim	Não	N.A	
2.1 EQUIPAMENTOS:				62,50%
2.1.1	1			
2.1.2	1			
2.1.3	1			
2.1.4	1			
2.1.5	1			
2.1.6		1		
2.1.7		1		
2.1.8		1		
2.2 MÓVEIS: (mesas, bancadas, vitrines, estantes)				100,00%
2.2.1	1			
2.2.2	1			
2.3 UTENSÍLIOS:				50,00%
2.3.1	1			
2.3.2		1		
2.4 HIGIENIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, MAQUINÁRIOS, E DOS MÓVEIS E UTENSÍLIOS:				55,56%
2.4.1		1		
2.4.2	1			
2.4.3		1		
2.4.4	1			
2.4.5	1			
2.4.6		1		
2.4.7		1		
2.4.8	1			
2.4.9	1			
2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	13	8	0	61,90%
3. MANIPULADORES				
Item avaliado	Sim	Não	N.A	
3.1 VESTUÁRIO:				33,33%

3.1.1		1			
3.1.2		1			
3.1.3	1				
3.2 HÁBITOS HIGIÊNICOS:					66,67%
3.2.1	1				
3.2.2	1				
3.2.3		1			
3.3 ESTADO DE SAÚDE:					100,00%
3.3.1	1				
3.4 PROGRAMA DE CONTROLE DE SAÚDE:					0,00%
3.4.1		1			
3.4.2		1			
3.5 EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL:					100,00%
3.5.1	1				
3.6 PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO DOS MANIPULADORES E SUPERVISÃO:					0,00%
3.6.1		1			
3.6.2		1			
3.6.3		1			
3.6.4		1			
Resumo item 3: Manipuladores	5	9	0	35,71%	
4. PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO					
Item avaliado	Sim	Não	N.A		
4.1 MATÉRIA-PRIMA, INGREDIENTES E EMBALAGENS:					36,36%
4.1.1	1				
4.1.2		1			
4.1.3		1			
4.1.4		1			
4.1.5		1			
4.1.6	1				
4.1.7		1			
4.1.8	1				
4.1.9		1			
4.1.10		1			
4.1.11	1				
4.2 FLUXO DE PRODUÇÃO:					0,00%
4.2.1		1			
4.2.2		1			
4.2.3				1	
4.2.4		1			
4.3 ROTULAGEM E ARMAZENAMENTO DO PRODUTO-FINAL:					75,00%
4.3.1	1				

4.3.2	1			
4.3.3	1			
4.3.4	1			
4.3.5	1			
4.3.6		1		
4.3.7	1			
4.3.8				1
4.3.9		1		
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DO PRODUTO FINAL:				0,00%
4.4.1		1		
4.4.2		1		
4.4.3		1		
4.4.4		1		
4. PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO	10	16	2	38,46%
5. DOCUMENTAÇÃO				
Item avaliado	Sim	Não	N.A	
5.1 MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO:				0,00%
5.1.1		1		
5.2 PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRONIZADOS:				0,00%
5.2.1 Higienização das instalações equipamentos e utensílios				
5.2.1.1		1		
5.2.1.2		1		
5.2.2 Controle de potabilidade da água:				
5.2.2.1		1		
5.2.2.2		1		
5.2.3 Higiene e saúde dos manipuladores:				
5.2.3.1		1		
5.2.3.2		1		
5.2.4 Manejo dos resíduos:				
5.2.4.1		1		
5.2.4.2		1		
5.2.5 Manutenção preventiva e calibração de equipamentos.				
5.2.5.1		1		
5.2.5.2		1		
5.2.6 Controle integrado de vetores e pragas urbanas:				
5.2.6.1		1		
5.2.6.2		1		
5.2.7 Seleção das matérias-primas, ingredientes e embalagens:				
5.2.7.1		1		
5.2.7.2		1		

5.2.8 Programa de recolhimento de alimentos:			
5.2.8.1		1	
5.2.8.2		1	
5. DOCUMENTAÇÃO	0	17	0
			0,00%

Total de itens SIM	75
Total de itens Não	66
Total de itens N.A	16
% TOTAL DE ATENDIMENTO À RDC	53,19%

157

Item	% de atendimento
EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES	74,60%
EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	61,90%
MANIPULADORES	35,71%
PRODUÇÃO E TRANSPORTE DO ALIMENTO	38,46%
DOCUMENTAÇÃO	0,00%
TOTAL GERAL	53,19%

APÊNDICE IV

Identificação dos isolados de *Staphylococcus* sp. obtidos etapas de produção de queijo colonial nas duas agroindústrias do RS.

Amostra	Agroindústria	Etapa	Gram	Catalase	Coag Lâmina	Coag Tubo	Manitol	Lactose	Sacarose	Manose	Identificação	MALDI-TOF (Escore)
21	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.359)
25	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.189)
56	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.187)
61	A	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. haemolyticus</i> (2.027)
69	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.439)
71	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.387)
90	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.373)
92	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.351)
93	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.352)
112	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.285)
117	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.276)
119	A	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.274)
146	A	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.269)
148	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.193)
157	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.158)
163	B	leite cru	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.087)
176	B	leite cru	T	T	N	N	T	N	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciun</i> (2.066)
177	A	leite cru	T	T	N	N	T	N	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciun</i> (2.035)
26	B	massa	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. warren</i> (2.050)
72	B	massa	T	T	T	T	T	T	T	T	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.395)
164	B	massa	T	T	N	N	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.296)
165	A	massa	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciun</i> (2.134)
22	B	queijo em maturação	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.386)
24	A	queijo em maturação	T	T	N	N	T	T	N	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. warren</i> (2.018)
47	B	queijo em maturação	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.424)
50	B	queijo em maturação	T	T	T	T	T	T	N	N	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i> (2.208)
52	B	queijo em maturação	T	T	N	N	T	T	T	F	<i>S. sciun</i>	<i>S. sciun</i> (2.032)
89	B	queijo em maturação	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciun</i> (2.023)
183	A	queijo em maturação	T	T	N	N	T	T	T	F	<i>S. sciun</i>	<i>S. sciun</i> (2.020)
188	B	queijo em maturação	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. saprophyticus</i> (2.011)
200	B	queijo em maturação	T	T	N	N	T	N	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. xylosus</i> (2.005)
204	A	queijo colonial	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.357)
206	B	queijo colonial	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.344)
82	A	queijo colonial	T	T	T	T	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.332)
84	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.321)
87	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	F	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.234)
106	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. haemolyticus</i> (2.124)
139	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>S. sciun</i>	<i>S. sciun</i> (2.062)
167	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>S. sciun</i>	<i>S. sciun</i> (2.063)
186	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>S. sciun</i>	<i>S. sciun</i> (2.040)
192	B	queijo colonial	T	T	N	N	T	T	T	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciun</i> (2.011)

P: amostra positiva para o teste/prova realizada; N: amostra negativa para teste/prova realizada.

Identificação isolados de *Staphylococcus* sp. obtidos das amostras das superfícies de produção do queijo colonial e manipuladores nas agroindústrias.

Amostra	Agroindústria	Superfície	Gram	Catalase	Coag Lâmina	Coag Tubo	Manitol	Lactose	Sacarose	Manose	Identificação	MALDI-TOF (Escore)
16	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.503)
44	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i> (2.400)
46	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.366)
57	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.341)
59	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.332)
191	B	Tanque de produção	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.275)
02	A	Mesa de produção	P	P	N*	N	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.219)
40	A	Mesa de produção	P	P	N	N	P	P	P	N	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i> (2.195)
73	A	Mesa de produção	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. sciuri</i> (2.121)
102	B	Mesa de produção	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>S. wameri</i>	<i>S. wameri</i> (2.096)
190	A	Mesa de produção	P	P	N	N					<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i> (2.064)
41	A	Forma	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. wameri</i> 2.138
151	A	Forma	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. wameri</i> (2.081)
01	A	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>S. equorum</i>	<i>S. equorum</i> (2.313)
14	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i> (2.305)
42	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i> (2.223)
43	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. wameri</i> (2.162)
104	A	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. wameri</i> (2.132)
153	A	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	N	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. saprophyticus</i> (2.105)
170	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.075)
189	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i> (2.058)
193	B	Superfície de maturação	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.032)
75	A	Manipulador	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.547)
05	B	Manipulador	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.423)
09	A	Manipulador	P	P	P	P	P	P	P	P	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (2.362)
133	B	Manipulador	P	P	N	N	N	N	P	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. homnis</i> (2.288)
04	A	Manipulador	P	P	N	N	P	P	P	P	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. equorum</i> (2.224)
08	A	Manipulador	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>S. wameri</i>	<i>S. wameri</i> (2.212)
67	A	Manipulador	P	P	N	N	P	N	P	N	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. wameri</i> (2.191)

P: amostra positiva para o teste/prova realizada; N: amostra negativa para teste/prova realizada, □

Food Science and Technology (Campinas)



**HYGIENIC-SANITARY CHARACTERIZATION OF COLONIAL
CHEESE PRODUCTION PROCESS IN DAIRIES OF RIO
GRANDE DO SUL, BRAZIL.**

Journal:	Food Science and Technology (Campinas)
Manuscript ID:	CTA-2017-0140
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	good practices, mesophiles, coliforms, <i>Staphylococcus</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts