

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS ISOLADOS DE
QUEIJO ARTESANAL SERRANO QUANTO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS E SUA RESISTÊNCIA AO QUATERNÁRIO DE AMÔNIA

Autora: Marina Hiller Sternadt

PORTO ALEGRE

2018/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS ISOLADOS DE
QUEIJO ARTESANAL SERRANO QUANTO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS E SUA RESISTÊNCIA AO QUATERNÁRIO DE AMÔNIA

Autora: Marina Hiller Sternadt

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

Orientadora: Professora Dra. Andrea Troller Pinto

Porto Alegre

2018/2

RESUMO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é produzido a partir de técnicas artesanais que incluem o uso de leite cru de vacas de raças de corte alimentadas com pasto nativo da região serrana dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo considerado parte importante da história, cultura e economia desta região. Entretanto, as características da produção tradicional deste produto acarretam dificuldades em adequar a produção com as exigências da legislação vigente, tornando a comercialização deste produto predominantemente de forma irregular. As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas sérios problemas de saúde pública, sendo a contaminação microbiana dos queijos artesanais considerada uma das causas destas doenças. O objetivo deste trabalho foi, a partir de microrganismos identificados de QAS, caracterizá-los quanto ao seu crescimento e atividade proteolítica, além de resistência ao quaternário de amônio. Neste estudo, nove amostras de QAS foram submetidas a análises microbiológicas, identificando presença de algumas espécies bacterianas possivelmente patogênicas (*Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Lactococcus garvieae* e *Raoultella ornithinolytica*). Os microrganismos foram submetidos a teste de eficácia de sanitizantes, sendo testadas três concentrações de quaternário de amônio, além de análise de crescimento em diferentes temperaturas ($37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias) e produção de enzimas proteolíticas. Os resultados obtidos indicaram crescimento bacteriano em todas as temperaturas testadas, ausência de proteólise na maioria dos microrganismos (97%), bem como falta de efetividade no combate aos patógenos com quaternário de amônio nas concentrações 1:3000 e 1:2000 – indicadas pelo fabricante – e alta eficácia na concentração 1:500.

Palavras-chave: microbiologia, queijo, proteólise, sanitizante.

ABSTRACT

Serrano Cheese is produced using hand-made techniques that include the use of raw milk from beef cattle fed with grass native to the mountainous region of the States of *Santa Catarina* and *Rio Grande do Sul*, being considered an important part of the history, culture and economy of this region. However, the characteristics of the traditional production of this good cause difficulties in adjusting production to the requirements of current legislation, making the commercialization of this good predominantly irregular. Food diseases are considered serious public health problems, and microbial contamination of hand-made cheese is considered to be one of the causes of these diseases. The objective of this paper is to characterize them as to their growth and proteolytic activity, as well as resistance to the ammonium quaternary, from the identified microorganisms. In this paper, nine samples from *Serrano* Cheese were submitted to microbiology analysis, identifying presence of some bacterian species, possibly pathogenic (*Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Lactococcus garvieae* e *Raoultella ornithinolytica*). The microorganisms were submitted in a sanitizers efficiency test, being tested three concentrations of ammonium quaternary, besides growth analysis in different temperatures ($37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours and $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 10 days) , and proteolytic enzymes production. The results indicated bacterial growth at all tested temperatures, absence of proteolysis in most of the microorganisms, as well as lack of effectiveness against the pathogens with ammonium quaternary in concentrations 1:3000 and 1:2000 - indicated by the manufacturer - and high efficiency in the 1:500 concentration.

Key words: microbiology, cheese, proteolysis, sanitizing.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de Enzimas Proteolíticas.....	16
Tabela 2 – Resultados do Teste de Eficácia de Sanitizantes.....	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Queijo Artesanal Serrano.....	7
2.2 Qualidade e Inocuidade.....	7
2.3 Bactérias de Interesse Avaliadas Neste Estudo.....	8
2.3.1 <i>Citrobacter freundii</i>	8
2.3.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	8
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	9
2.3.4 <i>Hafnia alvei</i>	10
2.3.5 <i>Lactococcus garvieae</i>	11
2.3.6 <i>Raoultella ornithinolytica</i>	11
2.4 Modificações Estruturais dos Queijos - Proteólise.....	12
2.5 Desinfetantes.....	12
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Crescimento em Diferentes Temperaturas e Produção de Enzimas Proteolíticas...14	
3.2 Teste de Eficácia de Sanitizantes.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Crescimento em Diferentes Temperaturas e Produção de Enzimas Proteolíticas...16	
4.2 Teste de Eficácia de Sanitizantes.....	17
5 CONCLUSÕES.....	20
6 REFERÊNCIAS.....	21
ANEXO I – Fluxograma da Metodologia.....	28
ANEXO II – Resultados Gerais.....	29

1 INTRODUÇÃO

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é um produto típico da região de serra dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo considerado parte importante da história, cultura e economia da região (CÓRDOVA et al., 2014; CRUZ et al., 2008). Sua produção é caracterizada por técnicas artesanais, que incluem o uso de leite cru de vacas de raças de corte alimentadas com pasto nativo da região. Esse fator associado ao microclima da região em que é produzido garantem ao QAS características físicas e organolépticas únicas do produto (KRONE, 2009). Porém, as características da produção tradicional deste produto geram dificuldade de adequar a produção com as exigências da legislação vigente, o que acarreta comercialização de forma irregular (CRUZ et al., 2008).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são consideradas um importante problema de saúde pública, sendo fatores como a má conservação dos alimentos e manipulação inadequadas responsáveis pela transmissão de muitos patógenos aos seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010).

A contaminação microbiana dos queijos artesanais é considerada uma das principais causas de DTAs (TOZZO et al., 2015). A fabricação de queijos artesanais é, geralmente, realizada em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, sem a adoção de boas práticas de fabricação, não apresentando segurança microbiológica e padronização de qualidade bem como escassa fiscalização e controle sanitário na produção e comercialização desses alimentos (SANTANA et al., 2008).

Neste estudo, nove amostras de QAS foram submetidas a análises microbiológicas, identificando presença de algumas espécies possivelmente patogênicas, sendo em maioria pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, a qual tem sido considerada indicadora de higiene no processamento de alimentos (OJER-USOZ et al., 2013). Os microrganismos foram submetidos a teste de eficácia de sanitizantes, sendo testadas três concentrações de quaternário de amônio, além de análise de crescimento em diferentes temperaturas ($37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias) e produção de enzimas proteolíticas.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a população bacteriana do QAS, quanto às espécies potencialmente patogênicas presentes, atividade proteolítica e resistência ao quaternário de amônio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo Artesanal Serrano

O Queijo Artesanal Serrano (QAS) é um produto associado especialmente à região que compreende a Serra Catarinense e os Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul sendo sua produção atrelada a fatores como clima, relevo, povoamento e cultura (CÓRDOVA et al., 2014).

A fabricação do QAS é considerada uma tradição secular que foi passada através de gerações, perpetuando a receita ao longo do tempo sem significativas modificações. Possui características físicas e organolépticas únicas, fato que se deve ao microclima da região em que é produzido, além das técnicas artesanais utilizadas na sua fabricação, que inclui o uso de leite cru de vacas de corte alimentadas com pasto nativo da região (KRONE, 2009).

Apesar da importância histórica, social, cultural e econômica do QAS, sua comercialização é realizada majoritariamente de forma irregular. Esse fato se deve à dificuldade de conciliar as exigências da legislação vigente com as características da produção tradicional desse produto (CRUZ et al., 2008).

2.2 Qualidade e Inocuidade

A inocuidade é a característica do alimento que garante que ele não cause danos ao consumidor, quando preparados e/ou consumidos adequadamente. Portanto, a produção de alimentos deve ser isenta de perigos, ou seja, os alimentos devem ser livres de agentes biológicos, químicos ou físicos ou condição do alimento com potencial para causar efeitos adversos à saúde (ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE, 2006).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) representam um sério problema de saúde pública pela elevada frequência de casos e pelo grande número de microrganismos que podem estar envolvidos em surtos. Há diversos patógenos alimentares que são conhecidos por causarem doenças, sendo veiculados por alimentos e água. A transmissão de muitos patógenos aos seres humanos ocorre pela má conservação dos alimentos e manipulação inadequadas. Espécies bacterianas frequentemente envolvidas em ocorrências de DTA são *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2010).

Por ser um dos principais produtos derivados do leite, os queijos servem de substrato para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, que podem ser potenciais causadores de doenças ou intoxicações alimentares (RUTHES; GOULARTE, 2013). Em geral, a produção de queijos em condições insalubres, associados a falhas no controle da

matéria prima, higienização dos utensílios, estocagem e processamento permitem que produtos de baixa qualidade cheguem ao mercado consumidor (FAVA et al., 2012).

A contaminação microbiana dos queijos artesanais é um grave problema de saúde pública, sendo considerado um dos principais veículos capazes de causar DTA (TOZZO et al., 2015). A fabricação de queijos artesanais é, geralmente, realizada em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, sem a adoção de boas práticas de fabricação, não apresentando segurança microbiológica e padronização de qualidade bem como escassa fiscalização e controle sanitário na produção e comercialização desses alimentos (SANTANA et al., 2008).

A composição nutricional do leite o torna um excelente substrato para o crescimento de microrganismos, portanto, o controle de qualidade do leite utilizado como matéria-prima é fundamental para garantir a qualidade dos produtos derivados. Do ponto de vista microbiológico, a produção do leite é o primeiro ponto de controle no processamento de produtos lácteos. A qualidade do leite cru é influenciada por fatores zootécnicos (manejo, alimentação e potencial genético do rebanho) que são responsáveis pelas características de composição do leite e produtividade, e a fatores relacionados à obtenção do leite destacando a qualidade microbiológica, sobretudo da ordenha (GERMANO; GERMANO, 2011).

2.3 Bactérias de Interesse Avaliadas Neste Estudo

2.3.1 *Citrobacter freundii*

Citrobacter é um gênero de bactérias Gram-negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (MULLAN et al., 1978), sendo as espécies desta família comumente utilizadas como indicadores de higiene no processamento de alimentos (OJER-USOZ et al., 2013). As espécies de *Citrobacter* são frequentemente encontradas nas fezes das crianças onde são, geralmente, consideradas como componentes normais da microflora intestinal (GUARINO et al., 1987).

A espécie *Citrobacter freundii* classicamente é considerada residente comensal no trato intestinal de humanos e animais. Há evidências que demonstram o fato de que alguns isolados adquiriram características de virulência e podem causar diarreia e outras infecções em humanos. *C. freundii* causou infecções esporádicas e surtos (GUERRANT et al., 1976; BAI et al., 2012).

2.3.2 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus é um gênero bacteriano de cocos Gram-positivos, facultativamente anaeróbios, que formam cadeias de vários comprimentos. São microrganismos relativamente resistentes e versáteis, com uma capacidade particular de sobreviver sob condições adversas, como altas concentrações de sal, e em uma ampla faixa de temperaturas, que pode variar de 10°C a 45°C (ARIAS; MURRAY, 2012).

A primeira descrição de uma infecção enterocócica, nomeadamente endocardite infecciosa, ocorreu em 1899 (MACCALLUM; HASTINGS, 1899), subsequente a esse caso, os enterococos mostraram potencial para causar uma variedade de infecções na população, dentre elas infecções pélvicas, infecções neonatais e infecções do trato urinário, bem como endocardite infecciosa. Entretanto, apesar de seu potencial patogênico, o gênero *Enterococcus* geralmente apresenta baixo nível de virulência, como evidenciado por sua presença como colonizadores naturais do trato gastrointestinal na maioria dos humanos e animais e pelo fato de terem sido usados com segurança por décadas como probióticos em humanos e animais de fazenda (ARIAS; MURRAY, 2012).

E. faecalis é um patógeno predominante em vacas infectadas por mastite, afetando a saúde do úbere e a qualidade do leite (RYSANEK et al., 2009). Por outro lado, sendo uma bactéria ácido láctica, *E. faecalis* está associado a produtos alimentares, contribuindo para o amadurecimento e desenvolvimento do aroma na produção de queijo tradicional e é, geralmente, predominante em queijos mediterrânicos maduros (FRANZ et al., 2003).

2.3.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* consiste em bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (EWING, 1986). A espécie *E. coli* é amplamente distribuída, sendo o principal anaeróbio facultativo que habita o intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (CONWAY, 1995).

Embora a maioria das cepas de *E. coli* viva inofensivamente no cólon e raramente causem doença em indivíduos saudáveis, várias cepas patogênicas podem causar doenças intestinais e extraintestinais tanto em indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (KAPER et al., 2004).

E. coli é um importante microrganismo indicador de qualidade em alimentos e sua presença é um indicador de contaminação fecal direta ou indireta, além de ser também um indicador da possível presença de patógenos entéricos, como *Salmonella*, em alimentos (GONZALEZ et al., 2003).

E. coli produtora de toxina Shiga (STEC) está associada a doenças humanas desde diarreia não complicada até colite hemorrágica e complicações que ameaçam a vida, como a síndrome urêmica hemolítica, que é a principal causa de insuficiência renal aguda em crianças (TARR et al., 2005). Em todo o mundo, os alimentos representam um veículo importante para a transmissão de infecções humanas por STEC. Leite não pasteurizado e produtos lácteos, incluindo queijo, também foram associados a surtos de STEC. Sob más práticas higiênicas, o STEC pode ter acesso ao leite cru por contaminação fecal durante o processo de ordenha, uma vez que os ruminantes representam importantes reservatórios naturais de STEC (ZWEIFEL et al., 2010).

2.3.4 *Hafnia alvei*

O gênero *Hafnia* compõe a família *Enterobacteriaceae*, sendo um dos mais de 40 gêneros participantes desse grupo. Outras nomenclaturas podem ser encontradas na literatura como *Enterobacter alvei*, *Enterobacter aerogenes* subsp. *hafniae* e *Enterobacter hafniae* (JANDA; ABBOTT, 2006).

As bactérias do gênero *Hafnia* são bastonetes Gram-negativos, móveis e anaeróbias facultativas (MUKHERIEE; MISRA, 2008). *H. alvei* é considerada a única espécie de relevância desse grupo tanto para a indústria alimentícia quanto para a clínica, uma vez que tem importância tanto na deterioração de produtos cárneos (JAY, 2005) quanto em infecções hospitalares, que incluem gastroenterites, septicemia e infecções do trato urinário em humanos (CHEN et al.; 2010).

H. alvei pode ser encontrada em mamíferos, aves, répteis, peixes, no solo, esgoto e em fontes alimentares, sendo o trato intestinal dos mamíferos considerado o habitat mais comum. Essa bactéria pode ser encontrada também em produtos alimentícios como carnes, moída ou com armazenamento a vácuo, mel (JANDA; ABBOTT, 2006), além de ser frequentemente isolada em leite cru e em diversos tipos de queijo (DELBES-PAUS et al., 2012).

Casos de bacteremia causadas por *Hafnia* são pouco relatados. Os sintomas mais comumente associadas são febre (38,6-40,5°C), calafrios e dor abdominal (JANDA; ABBOTT, 2006). É possível ainda observar sintomas como septicemia, meningite, pneumonias e abscessos, (MUKHERIEE, MISRA, 2008), além de diarreia ou fezes escurecidas com sangue (JANDA; ABBOTT, 2006). A maioria das infecções descritas na literatura estão relacionadas com pacientes imunodeprimidos ou com doenças concomitantes (FRICK et al., 1990).

2.3.5 *Lactococcus garvieae*

Lactococcus são cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos, catalase-negativos, em cadeias curtas ou pares tradicionalmente considerados de baixa virulência para seres humanos (COLLINS et al., 1983).

Entre as oito espécies e subespécies, *L. garvieae* é responsável pela maioria dos casos relatados de infecções oportunistas em humanos na literatura. A síndrome clínica mais bem reconhecida das infecções humanas por *L. garvieae* é a endocardite infecciosa envolvendo válvulas nativas ou protéticas. Outras entidades relatadas incluíram abscesso hepático, peritonite, diverticulite e espondilodiscite infecciosa em associação com endocardite (CHAN et al., 2011).

Embora *L. garvieae* tenha sido identificado como o agente etiológico da lactococose em peixes, tem sido relatado também como um componente das populações bacterianas de certos queijos artesanais fabricados a partir de leite crus (FORTINA et al., 2003; FOSCHINO et al., 2006).

Cepas de *L. garvieae* de origem láctea mostraram-se livres de determinantes de virulência, tais como hemolisinas e gelatinase (FORTINA et al., 2007), sugerindo que as cepas de *L. garvieae* não são relacionadas com as cepas patogênicas (FOSCHINO et al., 2008). Isso concorda bem com a falta de associação entre o consumo de queijo de leite cru e doenças humanas. Além disso, acredita-se que a atividade de cepas de *L. garvieae* em produtos lácteos pode contribuir para suas características sensoriais finais (FORTINA et al., 2007).

2.3.6 *Raoultella ornithinolytica*

R. ornithinolytica pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo encapsulado, imóvel, oxidase negativo e anaeróbio facultativo, tendo tanto o metabolismo respiratório quanto o fermentativo (DRANCOURT et al., 2001).

Esse microrganismo é encontrado em ambientes aquáticos, peixes e insetos (MORAIS et al., 2009), sendo isolada dos intestinos de peixes, carrapatos, cupins e de águas estuarinas. É produtora de histamina, o que contribui com a intoxicação por pescado (KANKI et al., 2002).

O sinal mais comum de intoxicação por histamina é pele avermelhada, principalmente na parte superior do tronco, rosto e braços. Além disso, há relatos de sintomas como dores de cabeça, cólicas abdominais, e, mais raramente, taquicardia, hipotensão e

broncoespasmo (MORAIS et al., 2009). Entretanto, infecções causadas pelo gênero *Raoultella* são infrequentes e não há relato de bacteremias espontâneas (KANKI et al., 2002).

2.4 Modificações Estruturais dos Queijos - Proteólise

As enzimas podem ter efeitos positivos na indústria de laticínios, sendo muito utilizadas na fabricação de produtos lácteos, aumentando seu valor e qualidade, gerando características sensoriais desejáveis, como textura, sabor e aroma e aumentando o valor nutricional. O coalho pode ser citado como exemplo de enzima usada em laticínios, trata-se de uma protease de origem animal, que é importante na fabricação de queijos. Entretanto, as enzimas também podem gerar efeitos indesejáveis a produtos lácteos, sendo responsáveis pela produção de aromas e sabores anormais, como amargor e rancidez, reduzindo o rendimento e encurtando a vida útil dos produtos lácteos (TEH et al., 2014).

Há uma variedade de microrganismos, incluindo espécies dos gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp., que são encontradas no ambiente de unidades produtoras de leite e laticínios e que podem produzir enzimas bacterianas, como proteases e lipases. O final da fase exponencial e início da fase estacionária do crescimento bacteriano são, geralmente, os momentos em que ocorre a produção das enzimas, que é considerado um processo complexo influenciado por variados fatores ambientais e fatores intrínsecos dos microrganismos (TEH et al., 2014).

2.5 Desinfetantes

Desinfetantes são substâncias ou preparações químicas aplicadas em objetos, com capacidade de destruir microrganismos patogênicos, em curto espaço de tempo (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Eleger um desinfetante para uso consiste em análise criteriosa que deve levar em conta aspectos como: efeito residual sobre os alimentos, uso autorizado pela legislação, custo, grau de toxicidade, poder corrosivo e efeito sobre o meio ambiente (ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

Os quaternários de amônio são surfactantes catiônicos utilizados como antissépticos e desinfetantes (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). São compostos carregados positivamente, cujo modo de ação ocorre através da atração por materiais carregados negativamente ou estruturas como as proteínas bacterianas. São ativos em uma ampla faixa de temperatura e apresentam melhor atividade em pH alcalino, não tendo efeito corrosivo sobre superfícies (SCHMIDT, 1997). O quaternário de amônio está entre os desinfetantes mais utilizados em indústrias de alimentos (HOLAH et al., 2002).

O aparecimento de microrganismos resistentes a desinfetantes pode representar perdas econômicas para a indústria de alimentos e trazer implicações para a saúde pública. A adaptação dos microrganismos aos desinfetantes pode ocorrer em consequência de superfícies com enxágue deficiente, deixando baixas concentrações de desinfetantes nas superfícies (MACHADO et al., 2010).

3 METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de nove queijos artesanais serranos, provenientes de produtores rurais do município de São Francisco de Paula – RS. Em laboratório, as referidas amostras foram submetidas a análises físico-químicas e microbiológicas, sendo as últimas o foco deste trabalho.

Na análise microbiológica foi realizado o método de contagem padrão em placa de mesófilos totais. A técnica de contagem padrão em placa consiste em diluir as amostras de 10^{-1} a 10^{-6} em água peptonada a 0,1%, posteriormente, semeia-se alíquotas de 0,1 ml em ágar para contagem, através da técnica de superfície. As placas foram submetidas à incubação em aerobiose a temperatura de 37°C por 48 horas e, após esse período, realiza-se a contagem das colônias naquela diluição em que se observou crescimento de 20 a 200 colônias. Destas placas, foram selecionadas aleatoriamente 10 colônias, segundo metodologia proposta por SCHMIDT (2002).

A manutenção das colônias foi realizada através de refrigeração em placas com *Plate Count Agar* (PCA) como meio de cultura e congelamento em criotubos em duplicata, sendo um criotubo contendo glicerol e outro contendo leite desnatado a 10%, atuando como crioprotetores.

A identificação das espécies de cada microrganismo isolado foi realizada através da utilização de sistema de espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplado à espectrometria de massas em tempo de voo (MALDI TOF MS), conforme protocolo descrito por GOULART (2017).

A coleta de amostras, a contagem padrão em placa de mesófilos totais bem como a identificação das espécies foram realizadas previamente, sendo este presente estudo responsável pela manutenção das colônias, análise de crescimentos em diferentes temperaturas e produção de enzimas proteolíticas, bem como pelo teste de eficácia de sanitizantes. No Anexo I pode-se observar um fluxograma representativo da metodologia.

3.1 Crescimento em Diferentes Temperaturas e Produção de Enzimas Proteolíticas.

A avaliação do crescimento em diferentes temperaturas, bem como da produção de enzimas proteolíticas, foi realizada em triplicata através da inoculação das bactérias em meio de cultura TSA suplementado com 5% de leite desnatado reconstituído a 10% e incubados na temperatura de $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada como controle positivo para verificação da qualidade do meio teste, visto que já é conhecida sua capacidade de produção de enzimas proteolíticas.

Os microrganismos foram considerados positivos para produção de enzimas proteolíticas quando houve formação de halo transparente circundando a zona de crescimento da colônia (GOULART, 2017).

3.2 Teste de Eficácia de Sanitizantes

Os microrganismos foram testados quanto a sua resistência ao desinfetante, segundo Portaria nº 101 do MAPA (BRASIL, 1993). O sanitizante utilizado na avaliação é comumente empregado na produção leiteira e na indústria de alimentos, tendo sido testado nas duas concentrações segundo instruções do fabricante: Cloreto de Alquil Dimetil Benzil Amônio a 1:2000 e a 1:3000. Além dessas, foi utilizada uma terceira concentração desse mesmo sanitizante não incluída nas instruções do fabricante: 1:500.

Segundo instruções do fabricante quanto às indicações de uso e dosagem, a concentração 1:3000 pode ser usada com a finalidade de desinfecção em geral, incluindo uniformes, paredes e piso, enquanto que a 1:2000 é indicada para equipamentos em geral, ordenhadeiras mecânicas, úberes, mãos do ordenhador, rodolúvio, pedilúvio, além de pulverização e desinfecção de cama de aves, aviários, câmaras, incubadoras, bandejas, maternidades e creches. Embora a concentração 1:500 não conste no rótulo do desinfetante utilizado neste estudo, há outras marcas que indicam-a para desinfecção em geral, além de desinfecção contra o vírus de Gumboro e Circovirus.

Os sanitizantes foram diluídos em água destilada estéril de forma a atingir a concentração desejada. Foram distribuídos 9 ml de cada concentração em diferentes tubos de ensaio. Antes de iniciar o ensaio, cada tubo contendo sanitizante recebeu 1 ml de leite UHT autoclavado, utilizado como fonte de matéria orgânica.

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo BHI, incubados por 20 horas à $37\pm 1^\circ\text{C}$ e observado turbidez do caldo como indicativo de crescimento bacteriano. Após esse período, foram diluídos em água peptonada 0,1% até a diluição 10^{-2} e desta adicionados 0,1 ml aos tubos com sanitizante. As amostras eram, então, homogeneizadas e cronometrava-se o tempo de exposição (5, 10, 15 e 20 minutos). Ao fim de cada período, foram alçadas alíquotas de $10\mu\text{L}$ para novos tubos contendo BHI, sendo incubadas à $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Anexo II, pode-se observar uma tabela com os resultados gerais do estudo, incluindo as amostras cujos microrganismos foram provenientes.

4.1 Crescimento em Diferentes Temperaturas e Produção de Enzimas Proteolíticas

Foi observado crescimento de todas as bactérias analisadas (*C. freundii*, *E. faecalis*, *E. coli*, *H. alvei*, *L. garvieae* e *R. ornithinolytica*) em todos os tempos e temperaturas de análise ($37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias).

Quanto à produção de enzimas proteolíticas, apenas uma das amostras de *E. faecalis* foi positiva para atividade proteolítica na temperatura de $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Enquanto que todas as outras amostras de *E. faecalis*, bem como as outras espécies bacterianas analisadas, não realizaram proteólise em nenhuma das temperaturas testadas. Os resultados obtidos na análise de produção de enzimas proteolíticas podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1 - Produção de Enzimas Proteolíticas

Microrganismo	Proteólise		
	7°C	20°C	36°C
<i>C. freundii</i>	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>H. alvei</i>	-	-	-
<i>L. garvieae</i>	-	-	-
<i>R. ornithinolytica</i>	-	-	-

Fonte: o próprio autor. Legenda: + indica produção de enzimas proteolíticas; - indica ausência de produção de enzimas proteolíticas.

As temperaturas testadas foram escolhidas pois simulam temperaturas ambientais em diferentes ocasiões, como dias de verão, de inverno, refrigeração e dias com temperaturas amenas.

Proteases com atividade proteolítica muito acentuada podem acarretar menor rendimento na fabricação de queijos pela perda de peptídeos no soro, além de ocasionar consideráveis defeitos de sabor e textura em queijos maturados pela proteólise excessiva e descontrolada (DE PAULA et al., 2009). O fato dos microrganismos analisados não realizarem proteólise, faz com que os queijos não apresentem consideráveis defeitos, sendo assim, a presença desses patógenos não é percebida pelo produtor, que coloca seu produto à venda com potencial para transmissão de DTA.

Em estudo realizado por Tebaldi et al. (2008), objetivou-se isolar microrganismos indicadores de qualidade em leite e analisar sua atividade proteolítica, verificando que dos 70 isolados de *Enterobacteriaceae* apenas 34,28% apresentaram atividade proteolítica, sendo um número baixo, porém ainda maior que os encontrados no presente estudo.

4.2 Teste de Eficácia de Sanitizantes

Analisando os resultados obtidos, pode-se verificar ineficiência da capacidade de inativação da maioria dos microrganismos analisados na concentração 1:3000, visto que esta foi eficaz apenas para *L. garvieae* e após 15 minutos de ação em uma das amostras de *E. faecalis*, sendo todas as outras bactérias testadas resistentes a essa concentração. A concentração 1:2000 também mostrou-se ineficaz para a maioria dos microrganismos testados, sendo sensíveis a esta apenas as duas bactérias já sensíveis a 1:3000 e após 20 minutos de ação em outra amostra de *E. faecalis*.

Quando utilizada a concentração 1:500, a maioria dos microrganismos mostraram-se sensíveis, sendo resistentes apenas uma das amostras de *E. coli* até 10 minutos de ação, *Hafnia alvei* até 5 minutos de ação e *R. ornithinolytica* até 10 minutos de ação.

Os resultados do teste de eficácia de sanitizantes podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados do Teste de Eficácia de Sanitizantes

Microrganismo	Diluição 1:3000				Diluição 1:2000				Diluição 1:500			
	5	10	15	20	5	10	15	20	5	10	15	20
<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. alvei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. garvieae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. ornithinolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Fonte: o próprio autor. Legenda: + indica crescimento bacteriano; - indica ausência de crescimento bacteriano; 5, 10, 15 e 20 referem-se aos minutos de exposição ao sanitizante.

Através dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que há microrganismos com potencial patogênico que não estão sendo eliminados com o uso da concentração prevista pelo fabricante do desinfetante, que é comumente usado na produção de alimentos, incluindo QAS. Esse fato é preocupante do ponto de vista de saúde pública, visto que serve como um indicador de possíveis surtos de DTAs nos consumidores do QAS.

Com os resultados deste estudo, pode-se perceber que o comportamento de resistência das diferentes *E. faecalis* analisadas variou consideravelmente, sendo algumas mais sensíveis e outras mais resistentes, mesmo sendo todas provenientes de um mesmo município. Visto que não foram coletados dados sobre o uso de desinfetantes nos locais de produção dos queijos analisados, a diferença de comportamento das diferentes amostras de *E. faecalis* abre espaço para questionamento quanto ao tipo de desinfetante que se usa nessas indústrias e ao modo de utilização dos mesmos. Essas informações seriam úteis para afirmar a causa desses diferentes resultados em *E. faecalis*, que pode ser proveniente de desenvolvimento de resistência ao sanitizante devido ao mau uso do produto.

Em estudo feito por Molina et al. (2010), analisou-se a sensibilidade de *E. coli* isolada de superfícies e equipamentos de matadouros frigoríficos frente a quaternário de amônio. Como resultado, os autores verificaram que as menores concentrações e tempos de contato para inativar as bactérias isoladas foram 1:80000 em 20 minutos e 1:40000 em 5 minutos, quando realizado o teste de suspensão na presença de matéria orgânica. Esse resultado mostrou, portanto, uma necessidade de concentração do quaternário de amônio bem menor que o presente estudo para inativar *E. coli*.

Collete et al. (2014) realizaram estudo isolando microrganismos de banheiros públicos e dentre os isolados escolheram as espécies *E. coli*, *Proteus* e *Staphylococcus* sp. para realizar análises quanto a resistência ao quaternário de amônio em

diferentes concentrações. Os resultados indicaram que a concentração 1:400 foi ineficaz para combater os microrganismos testados; 3:1000 foi eficaz para *E. coli*, mas ineficaz contra *Proteus* e *Staphylococcus* sp.; 2,8:1000 foi ineficaz contra *E. coli* e *Staphylococcus* sp.; apenas a concentração 4,5:1000 mostrou-se eficaz para todos os microrganismos testados. Estes resultados demonstram uma necessidade de concentração de quaternário de amônio ainda maior em comparação com as análises do presente estudo.

Quando comparados resultados de diferentes estudos, pode-se verificar grande variação de capacidade de resistência dos microrganismos ao quaternário de amônio, desde bactérias mais sensíveis até microrganismos mais resistentes, tornando relativa a eficiência do sanitizante.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos com este estudo pode-se observar que todos os microrganismos testados foram capazes de crescer nas três temperaturas de análise e que a maioria não foi capaz de realizar proteólise. Além disso, observou-se que as concentrações de quaternário de amônio recomendadas pelo fabricante não foram eficazes para impedir o crescimento da maioria das bactérias analisadas e que foi preciso utilizar uma concentração mais alta para que isso ocorresse.

No que diz respeito às espécies patogênicas encontradas nos queijos, conclui-se que é preciso melhorar as condições de produção do queijo artesanal serrano, bem como estabelecer legislação e fiscalização, no intuito de melhorar a qualidade deste produto que é um importante componente da cultura sulista brasileira. Além disso, é preciso instruir os produtores quanto a utilização de boas práticas de fabricação, incluindo correta higienização de instalações e equipamentos, além da correta higiene pessoal. Aprimorando o conhecimento sobre o QAS, pode-se melhorar a qualidade do produto, evitando defeitos nos queijos, bem como combatendo patógenos e contribuindo para a saúde pública.

Como sugestões para estudos futuros pode-se aprofundar as pesquisas sobre o comportamento destes microrganismos e entender sua permanência nos ambientes, como na produção de biofilmes, entre outros.

6 REFERÊNCIAS

- ALMUZARA, M.; BARBERIS, C.; TRAGLIA, G.; FAMIGLIETTI, A.; RAMIREZ, M. S.; VAY, C. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of nonfermenting gram-negative bacilli. **Journal of microbiological methods**, v. 112, p. 24-27, 2015.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266, 2012.
- BAI, L.; XIA, S.; LAN, R.; LIU, L.; YE, C.; WANG, Y.; DONG J.; ZHIGANG C.; HUAIQI J.; YANWEN X.; XUEMEI B.; HUI S.; JIN Z.; LEI W.; JIANGUO X. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33054, 2012.
- CHAN, J. F. W.; WOO, P. C. Y.; TENG, J. L. L.; LAU, S. K. P.; LEUNG, S. S. M.; TAM, F. C. C.; YUEN, K. Y. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. **Infection**, v. 39, n. 3, p. 259-264, 2011.
- CHEN, T. R.; WEI, Q. K.; CHEN, Y. J. *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. **Food Control**, v. 22, n. 5, p. 697-701, 2011.
- COLLETE, A. B.; SILVA, V. E.; SOUZA, J. M.; PIMENTA RODRIGUES, M. V. Avaliação da atividade bactericida de desinfetantes comerciais em amostras bacterianas isoladas de banheiros públicos. **Colloquium Vitae**, v. 6, n. 3, p. 42-52, 2014.
- COLLINS, M. D.; FARROW, J. A. E.; PHILLIPS, B. A.; KANDLER, O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. **Microbiology**, v. 129, n. 11, p. 3427-3431, 1983.
- CONWAY P. L. Microbial ecology of the human large intestine. In: Gibson GR, Macfarlane GT, eds. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1995:1-24.

CÓRDOVA, U. de A., SCHLICKMANN, A de F. de M. B. F., PINTO, C. E. A contribuição do queijo artesanal serrano para o desenvolvimento regional e preservação dos campos de altitude do sul do Brasil. **Desenvolvimento Regional em debate: DRd**, v. 4, n. 2, p. 103-114, 2014.

DA CRUZ, F. T., MENASCHE, R., KRONE, E. E., WAGNER, S. A. Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Cima da Serra: o saber-fazer tradicional desafiando a qualidade. *In*: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LA RED SIAL. 4., 2008, Mar Del Plata, Argentina. **Anais Eletrônicos**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/pgdr/publicacoes/producaotextual/fabiana-thome-da-cruz/cruz-fabiana-thome-da-menasche-renata-krone-evander-eloi-wagner-saionara-araujo-queijo-artesanal-serrano-dos-campos-de-cima-da-serra-o-saber-fazer-tradicional-desafiando-a-qualidade-in-iv-congresso-internacional-de-la-red-sial-mar-del-plata-argentina-2008>>. Acesso em: 21 set. 2018.

DRANCOURT, M.; BOLLET C.; CARTA A.; ROUSSELIER P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p.925-932, 2001.

DELBÈS-PAUS, C.; MISZCZYCHA, S.; GANET, S.; HELINCK, S.; VEISSEIRE, P.; POCHET, S.; THÉVENOT, D.; MONTEL, M. C. Behavior of *Escherichia coli* O26: H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 3, p. 212-218, 2013.

EWING, W. H. **Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae**. 4 ed. New York: Elsevier, 1986. 536 p.

FAVA, L.W.; HERNANDES, J. F. M.; PINTO, A. T.; SCHMIDT, V. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n.4, p.1-6, 2012.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P. L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 397-404, 2003.

FORTINA, M. G.; RICCI, G.; FOSCHINO, R.; PICOZZI, C.; DOLCI, P.; ZEPPA, G.; COCOLIN, L.; MANACHINI, P. L. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 445-453, 2007.

FOSCHINO, R.; PICOZZI, C.; BORGHI, M.; CERLIANI, M. C.; CRESCI, E. Investigation on the microflora of caprino lombardo cheese from raw goat milk. **Italian Journal of Food Science**, v. 18, n. 1, 2006.

FOSCHINO, R.; NUCERA, D.; VOLPONI, G.; PICOZZI, C.; ORTOFFI, M.; BOTTERO, M. T. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 3, p. 652-662, 2008.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International journal of food microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 105-122, 2003.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Manole, 2011. 1088p.

GONZÁLEZ, R. D.; TAMAGNINI L. M.; OLMOS P. D.; SOUSA G. B. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. **Food microbiology**, v. 20, n. 5, p. 601-604, 2003.

GOULART, J. Q. **Avaliação das características físico-químicas e rendimento do queijo fresco sem sal e iogurte natural produzidos a partir de leite contaminado com microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas**. 2017, 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Área: Microbiologia de

Alimentos Processados e "in Natura") - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2017.

GUARINO, A.; CAPANO, G.; MALAMISURA, B.; ALESSIO, M.; GUANDALINI, S.; RUBINO, A. Production of Escherichia coli STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 110-114, 1987.

GUERRANT, R. L., DICKENS, M. D., WENZEL, R. P., & KAPIKIAN, A. Z. Toxicogenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains. **The Journal of pediatrics**, v. 89, n. 6, p. 885-891, 1976.

HOLAH, J. T.; TAYLOR, J. H.; DAWSON, D. J.; HALL, K. E. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 92, p. 111S-120S, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p.12-28, 2006.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KANKI, M.; YODA, T.; TSUKAMOTO, T.; SHIBATA, T. *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3462-3466, 2002.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

KRONE, E. E. **Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS): práticas, saberes e modos de vida de pecuaristas familiares produtores do queijo serrano**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

MACCALLUM, W. G.; HASTINGS, T. W. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 4, n. 5-6, p. 521-534, 1899.

MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475-481, 2010.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MOLINA, P. D. S.; KINDLEIN, L.; BERGMANN, G. P.; AVANCINI, C. A. M. Simulação in vitro de condições de uso de desinfetantes e avaliação da eficácia frente bactérias sobreviventes a higienização de superfícies em matadouro-frigorífico de bovinos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, n. 3-4, p. 134-138, 2010.

MORAIS, V. P.; MORAIS, V. P.; DAPORTA, M. T.; BAO, A. F.; CAMPELLO, M. G.; ANDRÉS, G. Q. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 3, p. 868-869, 2009.

MUKHERJEE, C.; MISRA, A. K. First total synthesis of a pentasaccharide repeating unit of the O-antigen of *Hafnia alvei* PCM 1529. **Glycoconjugate journal**, v. 25, n. 2, p. 111-119, 2008.

MULLAN, N. A.; BURGESS, M. N.; NEWSOME, P. M. Characterization of a partially purified methanol-soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice. **Infection and Immunity**, v. 19, n. 3, p. 779-784, 1978.

OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A. I.; LEIVA, J.; GARCÍA-JALÓN, I.; FEBLES-CASQUERO, A.; ESCOLANO, M. S. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. **Meat science**, v. 93, n. 2, p. 316-321, 2013.

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

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. Agência nacional de vigilância sanitária. Food and agriculture for organization united nations. **Higiene dos alimentos: textos básicos**. Brasília, 2006. 64 p.

PONTAROLO, G. H. **Qualidade e inocuidade do queijo artesanal serrano, do leite e da água utilizados na sua produção, em Santa Catarina**. 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área: Saúde Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of food microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

RUTHES, L.D.; GOULARTE, M.M.M. Qualidade microbiológica de queijos de diversas regiões do Estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, v. 27, n. 218/219, p. 172-176, 2013.

RYSANEK, D.; ZOUHAROVA, M.; BABAK, V. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. **Journal of dairy research**, v. 76, n. 1, p. 117-123, 2009.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.S.; LIMA, A.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1577-1522, 2008.

SCHMIDT, R. H. Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. **University of Florida Cooperative Extension Service**, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS, 1997.

SCHMIDT, V. **Sobrevivência de microrganismos mesófilos e perfil físico-químico em estação de tratamento de dejetos suínos**. 2002, 120 f. Dissertação (Doutorado em Ciências

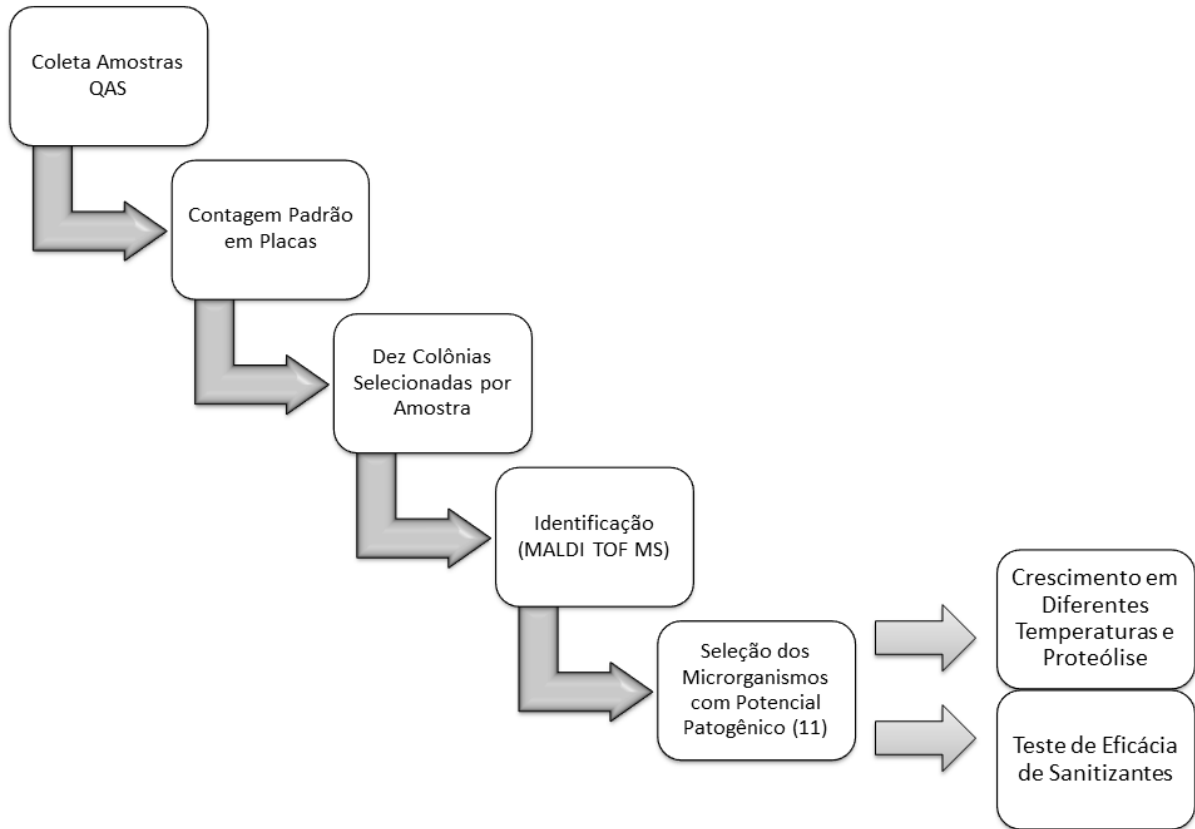
Veterinárias - Área: Bacteriologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, 2002.

TARR, P. I.; GORDON, C. A.; CHANDLER, W. L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1073-1086, 2005.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; ANDREWES, P.; BREMER, P.; LINDSAY, D. Biofilm– An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 32-40, 2014.

TOZZO, K.; GUIMARÃES, I. M.; CAMARGO, C. A. Avaliação microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel – PR. **Higiene Alimentar**, v. 29, n. 244/245, p. 149-154, 2015.

ZWEIFEL, C.; GIEZENDANNER, N.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; BEUTIN, L.; DANUSER, J.; STEPHAN, R. Characteristics of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Isolated from Swiss Raw Milk Cheese within a 3-Year Monitoring Program. **Journal of food protection**, v. 73, n. 1, p. 88-91, 2010.

ANEXO I – Fluxograma da Metodologia

ANEXO II – Resultados Gerais

AMOSTRA		PROTEÓLISE			CRESCIMENTO			SENSIBILIDADE QA
		7°C	20°C	36°C	7°C	20°C	36°C	
QAS	MICROORGANISMO							
1	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 5min
3	<i>H. alvei</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 10min
4	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 5min
5	<i>C. freundii</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 5min
5	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 5min
5	<i>L. garvieae</i>	-	-	-	+	+	+	1:3000, 5min
6	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	1:2000, 20min
7	<i>E. faecalis</i>	-	+	-	+	+	+	1:3000, 15min
7	<i>R. ornithinolytica</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 15min
8	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 5min
9	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	1:500, 15min