

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Débora Alves Ferreira da Silva

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL
COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2016

Débora Alves Ferreira da Silva

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL
COMERCIALIZADAS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Preceptor: Carla Oliveira Rosas

Tutor: Silvia Maria dos Reis Lopes

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Silva, Débora Alves Ferreira da

Análise microbiológica de amostras de queijo minas frescal comercializado no Estado do Rio de Janeiro / Débora Alves Ferreira da Silva – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

39 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptor: Carla Oliveira Rosas. Tutor: Silvia Maria dos Reis Lopes

1. Queijo. 2. Análise microbiológica. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Amostras de Alimentos. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Débora Alves Ferreira da Silva

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL
COMERCIALIZADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Carla de Oliveira Rosas (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e minha família, por todo apoio e sempre acreditar e vibrar com cada conquista minha. Obrigada por me fazer ser o ser humano que sou hoje. Agradeço especialmente ao meu pai, minha mãe e minha irmã por estarem sempre me ajudando e me incentivando.

Agradeço a todos do meu laboratório, que me receberam de braços abertos, sempre muito atenciosos e com muito carinho. Obrigada a minha preceptora Carla, por acreditar e confiar no meu trabalho, sou eternamente grata por todo carinho. A minha tutora Silvia, por todo o aprendizado e ajuda. A Valéria e Marcelo por estarem sempre dispostos a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas, obrigada por todo o ensinamento. A Gisele, Natália, Cátia e Maria Luiza por toda a ajuda ao longo do meu projeto, e a residente Carla Trece que me acompanhou durante todo meu projeto, obrigada por toda a ajuda e paciência.

Agradeço a todos os meus amigos de longa data e também aos novos. Agradeço especialmente a Bianca, minha alma gêmea de bancada, que no meu primeiro ano me mostrou como é bom trabalhar em equipe, obrigada por ter me ajudado a ficar um ano em uma área totalmente diferente da minha, na química. Agradeço também a Shaiene, por toda atenção, carinho e conselhos.

E especialmente queria agradecer ao Erick, meu namorado e amigo, por sempre acreditar em mim e vibrar com as minhas conquistas. Por nunca me deixar desistir e sempre me incentivar. Obrigada, obrigada por todo o carinho, por toda a palavra de apoio, por estar do meu lado sempre, por me ajudar a evoluir como pessoa.

RESUMO

O queijo minas frescal (QMF) é um alimento típico do Brasil, obtido por coagulação enzimática do leite. É um produto pronto para consumo com alta umidade, de fácil produção e grande aceitação por todas as faixas etárias da população. Devido ao fato da produção do QMF requerer muita manipulação, aliado a prática errada do uso do leite não pasteurizado por alguns fabricantes e a ausência de boas práticas de fabricação, este alimento pode apresentar uma alta carga microbiana, podendo ser fonte de micro-organismos causadores de doenças transmitidas por alimentos. Os padrões estabelecidos no Brasil estão presentes na RDC nº 12/2001, e são: ausência de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes* em 25g de amostra e o limite de 5×10^2 UFC/g para coliformes termotolerantes (CT) e para estafilococos coagulase positiva (ECP). Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica dos QMF industrializados, comercializados no estado do Rio de Janeiro. Para isso, 30 amostras foram adquiridas de pontos comerciais, com um total de 19 marcas contendo o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). As amostras foram submetidas a testes microbiológicos de acordo com as metodologias descritas na ISO 6888-3:2003 para a técnica do Número Mais Provável de ECP e do BAM/FDA, para os demais ensaios. Na análise de CT, 20 amostras (66,7%) apresentaram resultados insatisfatórios. Na contagem de ECP, nenhuma amostra apresentou resultado acima do limite da legislação, porém seis isolados apresentaram resultado positivo no teste da coagulase, da catalase e morfologia característica no Gram. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por *Salmonella* spp. Quatro amostras apresentaram crescimento de *L. monocytogenes*, com confirmação feita pela técnica de PCR. Outro resultado importante obtido foi que duas amostras testadas eram de uma mesma marca e pertencentes ao mesmo lote, mas compradas em supermercados diferentes. Porém, as amostras obtiveram resultados distintos, sendo uma insatisfatória para coliformes termotolerantes e *L. monocytogenes* e a outra satisfatória em todas as análises. Os resultados obtidos revelaram que mais de 50% das amostras testadas foram insatisfatórias, apesar de ter o selo SIF. Esses resultados sugerem contaminação por falhas durante a fabricação dos produtos, pela utilização de matérias primas contaminadas ou por manipulação inadequada. Outras possíveis fontes de contaminação poderiam ter ocorrido nas condições de transporte e armazenamento dos produtos no local de venda.

Palavras-Chave: Queijo minas frescal. Análise microbiológica. Rio de Janeiro. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The fresh cheese mines (QMF) is a typical food from Brazil, obtained by enzymatic milk clotting. It is a product ready for consumption with high humidity, with easy production and wide acceptance by all age groups of the population. Because the production QMF require a lot of handling, combined the practice of using unpasteurised milk and the absence of good manufacturing practices, this food has a high microbial load and can be a source of microorganisms causing DTA. The standards established in Brazil are present in the RDC 12/2001, and are: absence *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in 25g sample, the limit of 5×10^2 termotolorentes coliforms (CT) and 5×10^2 / g for coagulase-positive staphylococci (ECP). This work aimed to evaluate the microbiological quality of industrialized QMF, marketed in the city of Rio de Janeiro. To this, 30 samples were collected from commercial points, a total of 19 marks containing the SIF seal. The samples were subjected to microbiological testing according to the method described in ISO 6888-3: 2003 for the most probable number of ECP and BAM / FDA online to other assays. In the analysis of CT 20 samples (66.7%) had unsatisfactory results. In ECP count, none had results above the limit of the law, but six isolates had passed the test of coagulase, catalase and characteristic morphology in Gram. None of the samples showed contamination by *Salmonella* spp. Four samples showed growth of *L. monocytogenes*, with confirmation was made by PCR . Another important result was that two samples tested were of the same brand and belonging to the same lot, but purchased in different supermarkets. However, samples obtained different results, one unsatisfactory for *L. monocytogenes* and thermo tolerant coliforms and other satisfactory in all analyzes. The results show that over 50% of the samples tested were unsatisfactory, despite having the SIF seal. These results suggest contamination failures during the manufacture of the products by the use of contaminated raw materials or improper handling. Other possible sources of contamination could have occurred in the conditions of transport and storage of products at the sales wrongly.

Key words: Fresh cheese mines. Microbiological analysis. Rio de Janeiro. Sanitary surveillance.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Análise temporal do número de surtos e casos de DTA no Brasil entre os anos 2000 e agosto de 2014.	11
Fonte: Ministério da Saúde/ CGDT.....	11
Figura 2: Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre os anos 2000 e 2013.	11
Figura 3: Alimentos envolvidos nos surtos alimentares no Brasil, de 2000 a agosto de 2014.	12
Fonte: Ministério da Saúde/ CGDT.....	12
Figura 4: a. Petrifilm TM sem crescimento. b. Petrifilm TM com crescimento de colônias características de coliformes termotolerantes.	19
Figura 5: a. Tubos de caldo Giolitti e Cantoni contendo controle positivo (a esquerda) e controles negativos (a direita). 5b. Placa de Baird-parker inoculado com <i>S. aureus</i>	20
Figura 6: Coloração de Gram com uma cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 12600.....	21
Figura 7: Teste da catalase com a formação de bolhas na cepa positiva.....	22
Figura 8: Exemplo de coagulação de plasma de coelho com EDTA.	22
Figura 9: Cultura de <i>Listeria monocytogenes</i> em ágar cromogênico.	24
Quadro 1: Iniciadores utilizados nas reações de PCR.....	25
Tabela 1. Enumeração de coliformes termotolerantes em queijos minas frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro.....	26
Tabela 2. Resultados obtidos na contagem de estafilococos coagulase positiva.....	27
Tabela 3: Total de amostras analisadas divididas por marca com porcentagem de insatisfatoriedade.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µl	Microlitros
APPCC	análise de perigos e pontos críticos de controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção americana de cultura tipo)
BAM/FDA	<i>Bacteriological Analytical Manual/Food and Drug Administration</i> (Manual de análise bacteriológica/Administração de Alimentos e drogas)
BHI	<i>brain heart infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
BPF	Boas práticas de fabricação
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de controle e prevenção de doenças)
CGDT	Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
<i>Foodnet</i>	<i>Foodborne Diseases Active Surveillance Network</i> (Rede de Vigilância Ativa de Doenças Transmitidas por Alimentos)
g	gramas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)
Kg	quilogramas
Kg. L ⁻¹	quilogramas por litro
min	minuto
MG	Minas Gerais
mL	mililitro
MS	Ministério da Saúde
n°	número
ng	nanograma
NMP	Número mais provável

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Pmol	picomol
QMF	queijo minas frescal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
s	segundos
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
spp	espécies
TSAYE	<i>Trypticase Soy Broth</i> agar with Yeast Extract (Ágar Tripticaseína de soja com extrato de levedura)
UFC. g ⁻¹	Unidade formadora de colônias por grama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA).....	10
1.2 QUEIJO MINAS FRESCAL.....	12
1.3 CONTROLE DA QUALIDADE SANITÁRIA DO QUEIJO MINAS FRESCAL.....	13
1.3.1 Carga microbiana e legislação para queijo minas frescal.....	13
1.4 JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS	18
3.2 CONTAGEM DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES	18
3.3 PESQUISA E CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA	19
3.3.1 Testes de triagem bioquímica	20
3.3.1.1 Coloração de Gram.....	20
3.3.1.2. Teste da catalase	21
3.3.1.3. Teste da coagulase	22
3.4 PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp.	23
3.5 PESQUISA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	23
3.5.1 Confirmação das cepas isoladas por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

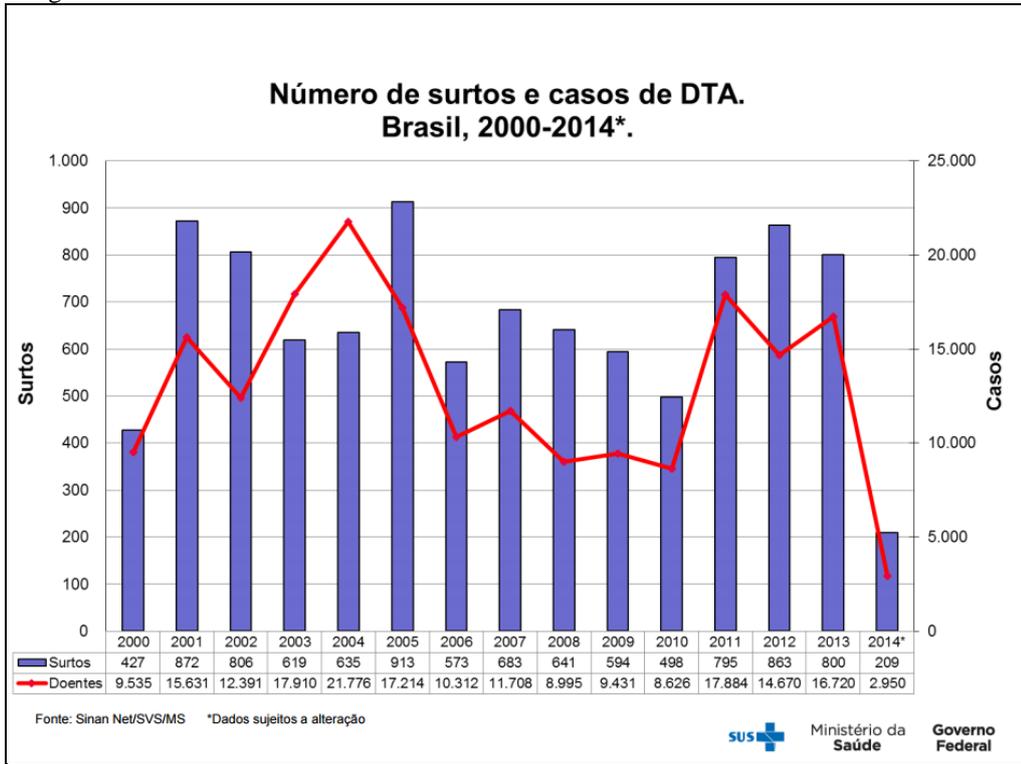
Por definição, as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são relacionadas à ingestão de alimentos contaminados, seja por micro-organismos patogênicos, toxinas microbianas, substâncias químicas ou objetos lesivos (FORSYTHE, 2013).

As doenças transmitidas por alimentos além de causarem prejuízos à saúde da população acarretam danos econômicos aos países. Dados europeus da Organização Mundial da Saúde (OMS) relatam salmonelose e campilobacteriose como as DTAs mais comuns na União Europeia (WHO/EUROPE, 2016).

Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos (EUA), é possível obter dados sobre surtos de DTAs. Segundo o site do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2015), através do *Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)* que realiza o monitoramento de doenças de transmissão alimentar nos EUA, somente no ano de 2014, foram confirmados 118 casos de listeriose e 7.452 casos de salmonelose. Como se tratam de DTAs com alta taxa de mortalidade e morbidade, respectivamente, o país estabeleceu uma meta de diminuição da incidência até 2020, de 0,2 casos de listeriose e 11,4 casos de salmonelose por 100.000 habitantes. Já em 2014, o país chegou perto da meta proposta obtendo 0,24 e 15,45/100.000 habitantes, respectivamente (CDC, 2015).

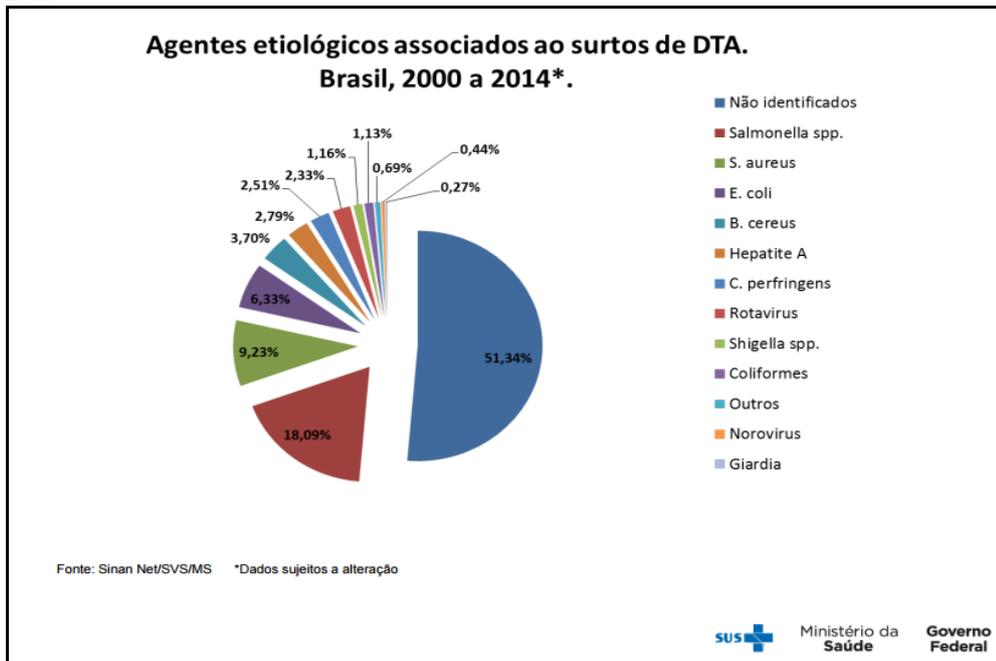
No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) divulga periodicamente a relação dos casos de DTA ocorridos no país. O último levantamento descreve o número de surtos entre 2010 e agosto de 2014 (Figura 1). No entanto, presume-se que ocorra subnotificação dos casos por parte dos profissionais de saúde, reforçado pela falta de orientação da população que somente procura assistência médica nos casos mais graves de infecção. Dados apresentados pelo Ministério da Saúde mostram que *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estão entre os principais agentes de surtos de DTAs no Brasil (Figura 2) (BRASIL, 2014).

Figura 1: Análise temporal do número de surtos e casos de DTA no Brasil entre os anos 2000 e agosto de 2014.



Fonte: Ministério da Saúde/ CGDT, 2014

Figura 2: Agentes etiológicos associados aos surtos de DTA no Brasil entre os anos 2000 e 2013.



Fonte: Adaptado Ministério da Saúde/ CGDT, 2014

De 2010 a agosto de 2014, um total de 9.802 surtos foram notificados no país, destes apenas 4.099 tiveram a veiculação alimentar identificada. Em relação ao local de ocorrência dos surtos, grande parte (38%) dos casos ocorreu em residências, seguindo de 14% dos casos em padarias e restaurantes. Entre os tipos de alimentos envolvidos nestes surtos, a categoria leite e derivados ocupa o 6º lugar, com 3,5% dos casos, sendo que em mais da metade dos casos (51,6%) não foi possível identificar o alimento envolvido (Figura 3) (BRASIL, 2014).

Figura 3: Alimentos envolvidos nos surtos alimentares no Brasil, de 2000 a agosto de 2014.



Fonte: Ministério da Saúde/ CGDT

1.2 QUEIJO MINAS FRESCAL

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, define o queijo minas frescal como um alimento obtido por coagulação enzimática do leite por coalho ou por outras enzimas coagulantes. É um produto pronto para consumo com alta umidade (BRASIL, 1996).

O queijo minas frescal ocupa o terceiro lugar no ranking de consumo de queijos no Brasil (MIRAGAIA, 2013). Por ser de fácil fabricação, por não precisar de maturação, e por apresentar bom rendimento, cerca de 6,0-6,5 Kg.L⁻¹ em média, torna-se um excelente produto de fabricação para empresas de grande e pequeno porte (AQUINO et al, 2009; CHALITA et al, 2009; FEITOSA et al, 2003)

A Portaria nº 146, de 07/03/96 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (BRASIL, 1996), prevê o uso de leite pasteurizado para a fabricação do queijo minas frescal, porém é comum a comercialização do produto fabricado com leite cru, principalmente por empresas de pequeno porte (ALEXANDRE et al, 2002; PEREIRA et al, 1999).

1.2.1 Controle da qualidade sanitária do queijo minas frescal

A presença de micro-organismos de origem fecal no queijo minas frescal indica falhas na produção e também a possibilidade de contaminação cruzada do produto por manipuladores (FORSYTHE, 2013; OLIVEIRA et al, 2001). Desta forma, para se obter um queijo de qualidade, é necessário um rigoroso controle das boas práticas de fabricação durante a produção, além do uso de matérias primas adequadas (ALBUQUERQUE; RODRIGUES, 2008; OLIVEIRA et al, 2012).

Por ser um alimento de pronto consumo, outro ponto crucial para a garantia da qualidade do queijo minas frescal é o armazenamento nos locais de venda. O queijo deve ser mantido sob refrigeração com controle de temperatura e sob boas condições sanitárias, em locais limpos e sem presença de vetores, a fim de se evitar a contaminação por micro-organismos (HAZELWOOD; MCLEAN, 1994; PIETROWSKI et al, 2008).

1.2.2 Carga microbiana e legislação para queijo minas frescal

Devido ao fato da produção do queijo minas frescal requerer muita manipulação, aliado a prática errada do uso do leite não pasteurizado e a ausência de boas práticas de fabricação por alguns produtores, este alimento eventualmente pode vir a apresentar uma alta

carga microbiana e ser fonte de micro-organismos causadores de DTAs (FORSYTHE, 2013; O'BRIEN et al, 2009; OLIVEIRA et al, 2001; SALOTTI et al, 2006). A alta umidade presente no queijo e o fato de ser um alimento não prensado que dessora, gera um acúmulo de soro na embalagem que propicia o crescimento microbiano (ISEPON et al, 2003).

O leite, matéria prima utilizada para a fabricação do queijo minas frescal, é considerado um excelente meio de cultura para bactérias devido às propriedades que apresenta como: disponibilidade de nutrientes, alta atividade de água e pH próximo ao neutro (JAY, 2005).

Para avaliar a qualidade microbiológica de queijo minas frescal são realizados ensaios de pesquisa de micro-organismos indicadores, que quando encontrados, podem sugerir a presença de patógenos. Desta forma, a presença desses micro-organismos pode indicar problemas durante a cadeia de produção do alimento (FORSYTHE, 2013).

Os padrões microbiológicos estabelecidos no Brasil variam de acordo com o tipo de queijo. A legislação RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece como parâmetros microbiológicos para queijo minas frescal, a ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 g do alimento, além dos limites máximos de 5×10^2 UFC.g⁻¹ ou NMP.g⁻¹ para coliformes termotolerantes e para bactérias do grupo dos estafilococos coagulase positiva (BRASIL, 2001).

Os coliformes termotolerantes estão presentes no trato gastrointestinal dos animais e são as principais bactérias responsáveis pela deterioração do queijo (ALMEIDA; FRANCO, 2003; JAY, 2005; OLIVEIRA et al, 1998). Essas bactérias são sensíveis a pasteurização, sendo utilizadas como micro-organismos indicadores de contaminações pós-processamento. O grupo dos coliformes termotolerantes compreende os bacilos Gram negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. O grupo é composto por quatro gêneros: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos que fermentam a lactose e produzem gás com crescimento a 45°C (JAY, 2005; SILVA et al, 2001).

A legislação prevê limites para os estafilococos coagulase positiva, sendo o principal representante deste grupo a espécie *Staphylococcus aureus*. Este micro-organismo coloniza a pele e o sistema respiratório de grande parte da população e são capazes de se multiplicar tanto nos tecidos quanto no alimento. Algumas espécies são produtoras de enterotoxinas termoestáveis no alimento (ALMEIDA; FRANCO, 2003). São bactérias em forma de cocos que se coram pelo Gram positivamente com apresentação ao microscópio como cachos de

uva. São anaeróbios facultativos e produtores da enzima catalase. (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY, 2005)

As Salmonelas pertencem ao grupo de bactérias entéricas e estão relacionadas a graves quadros de infecções alimentares em todo o mundo. São bactérias Gram negativas, flageladas ou não, que podem causar desde salmonelose (quadro de infecção gastrointestinal) até casos mais graves como a febre tifoide (*S. Typhi*) e febre enterica (*S. Paratyphi*). Devido à alta morbidade e seu importante papel nas DTAs a presença deste micro-organismo não é permitida em alimentos (ALTERTHUM, 2004; GERMANO; GERMANO, 2003; TRABULSI; JAY, 2005).

A espécie *L. monocytogenes* é responsável pela listeriose e possui grande importância para a saúde pública devido ao alto grau de severidade das sequelas e ao alto índice de mortalidade (20 a 30%) para a população de risco, que inclui indivíduos imunocomprometidos, gestantes e idosos. É uma bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa que não esporula e nem forma cápsula. Apresenta crescimento em uma grande faixa de temperatura de 1°C a 45°C e de pH 4.3 a 9.6. A listeriose pode causar aborto, meningite e septicemia, acometendo principalmente pacientes debilitados (JAY, 2005). A listeriose é uma doença negligenciada devido à falta de informação e fiscalização pelos órgãos de vigilância sanitária e por não se tratar de uma doença de notificação obrigatória. Nenhum caso de listeriose, como surto de DTA, foi relatado no país no período de 2000 a 2014, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) evidenciando o quanto o diagnóstico da listeriose é negligenciado no Brasil.

1.3 JUSTIFICATIVA

A vigilância sanitária tem como principal missão identificar, eliminar, diminuir, prevenir ou controlar os riscos inerentes à produção e circulação de produtos e serviços que possam causar danos e agravos à saúde, conforme inscrito na Constituição Federal e na Lei 8.080, de 1990. Por isso, o monitoramento das indústrias e de locais de produção de alimentos é de suma importância, pois previne que a população tenha acesso a produtos alimentícios de qualidade imprópria.

O queijo é um alimento que apresenta um elevado índice de contaminação microbiológica, acarretado por falhas na manipulação durante a fabricação e estocagem. O

grande consumo deste produto no mercado brasileiro torna-o uma possível fonte de DTA no país. A avaliação microbiológica do queijo minas frescal comercializado no Rio de Janeiro poderá gerar dados auxiliando a Vigilância Sanitária na avaliação da necessidade de programas de controle sanitário deste produto.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica de amostras de queijo minas frescal industrializadas e comercializadas no estado do Rio de Janeiro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a contagem de coliformes termotolerantes e de estafilococos coagulase positiva nas amostras de queijo minas frescal;
- ✓ Pesquisar *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em 25 gramas das amostras;
- ✓ Realizar a confirmação da espécie *L. monocytogenes* pela PCR;
- ✓ Verificar se as amostras analisadas estão em conformidade com a legislação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 30 amostras de queijo minas frescal, totalizando 19 diferentes marcas, todas apresentando selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). As análises foram realizadas entre os meses de maio e junho de 2015.

As amostras foram obtidas em estabelecimentos comerciais do estado do Rio de Janeiro (supermercados, mercados e padarias) e encaminhadas para análise no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS. As amostras, ao serem recebidas no laboratório, foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Todas as amostras foram analisadas dentro do prazo de validade.

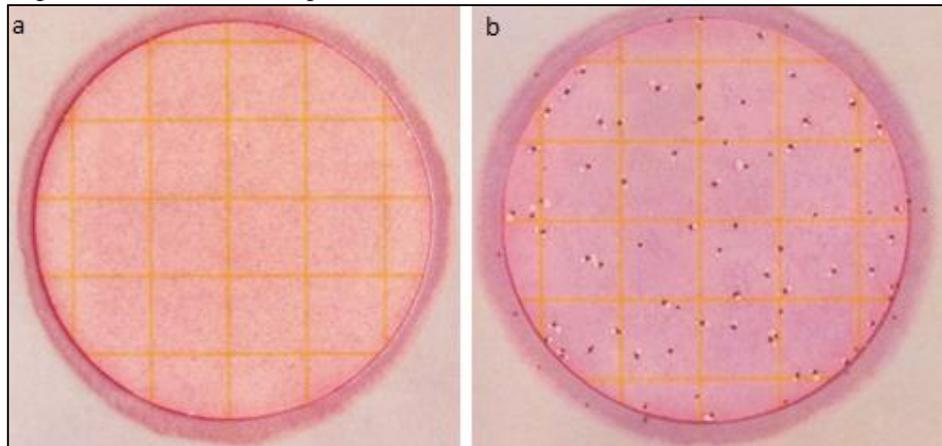
As amostras foram processadas em cabine de segurança biológica. As embalagens foram limpas com álcool 70% para retirada de possíveis contaminantes externos e abertas com tesoura estéril. Os produtos foram colocados em bandejas estéreis individuais para a retirada das alíquotas amostrais.

3.2 CONTAGEM DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

O preparo do homogenato e das diluições decimais seriadas foram realizados de acordo com a metodologia elaborada por FENG e colaboradores descrita no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), capítulo 4 (FENG et al, 2002). Para cada amostra, foram pesadas alíquotas de 50 g em bolsas plásticas estéreis Whirl-Pak (Nasco, EUA). Foram adicionados 450 mL de tampão fosfato de Butterfield. As amostras foram homogeneizadas em aparelho *Stomacher* (Seward – 400 lab. blender) durante 60 s. Após a homogeneização foram preparadas diluições seriadas até 10^{-4} . Um mililitro de cada uma das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram adicionados separadamente em três placas petrifilmTM para contagem de coliformes (3M) (Figura 4). Os procedimentos aplicados para a semeadura seguiram as instruções do fabricante. As placas petrifilm foram incubadas em estufa a uma temperatura de 45°C por 24

horas e, após o período de incubação, foi feita a contagem das colônias de coloração rosa, com produção de gás, características das bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes. Foram utilizados como controle positivo a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 e como controle negativo a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Figura 4: Placa Petrifilm™ para coliformes termotolerantes



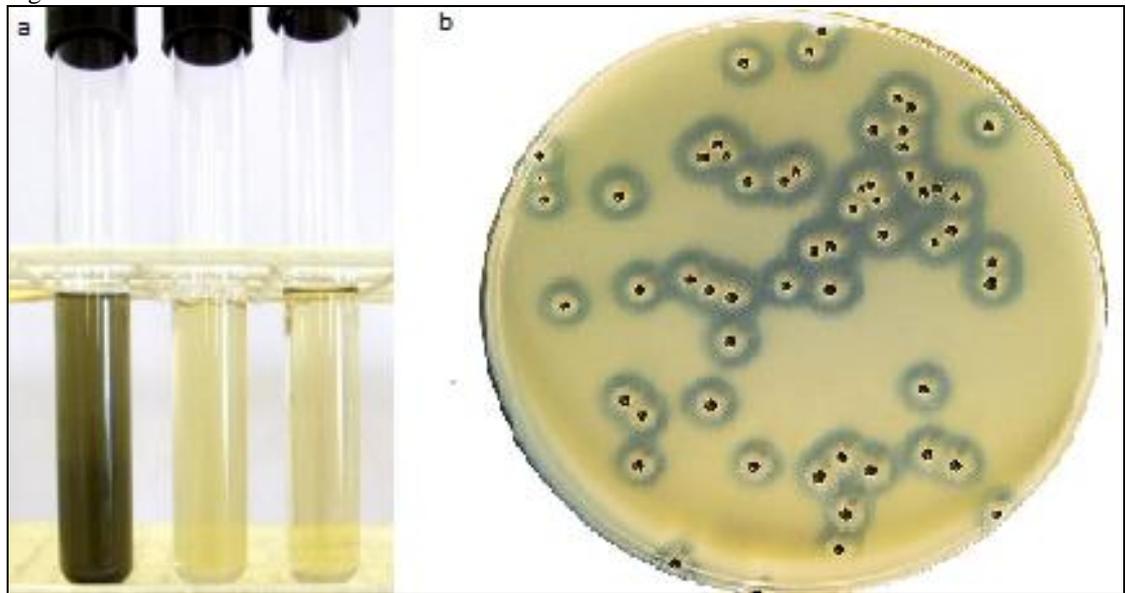
a. Petrifilm™ sem crescimento. b. Petrifilm™ com crescimento de colônias características de coliformes termotolerantes.
Fonte: Guia de interpretação 3M™ Petrifilm™.

3.3 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Para a análise de estafilococos coagulase positiva foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), de acordo com a metodologia da Norma ISO 6888-3:2003 (ISO, 2003). De cada amostra analisada foram aproveitados o homogenato e as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} utilizadas para pesquisa de coliformes termotolerantes. Foram inoculadas alíquotas de 1mL de cada diluição em três tubos contendo 10 mL de caldo Giolitti e Cantoni (BD, EUA). Os tubos foram incubados em jarra de anaerobiose a 35°C por 48 horas. A anaerobiose foi obtida através da técnica de passivação do cobre descrita por Jurgensen e Jurgensen (1982). Para os controle do experimento foram utilizadas uma cepa de *S. aureus* ATCC 12600 como controle positivo e uma cepa de *E. coli* ATCC 25922 como controle negativo e o controle do meio sem inóculo (Figura 5a). Após a incubação, os tubos que apresentaram coloração negra, compatível com o controle positivo, foram separados e em seguida uma alçada do

crescimento foi semeada em meio Baird-Parker (Figura 5b). As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após o tempo de incubação, foram selecionadas as placas que apresentaram crescimento de colônias negras, circulares, lisas, úmidas e rodeadas por halo. As colônias suspeitas foram semeadas nos meios: caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (BD, EUA) e em ágar nutriente inclinado (BD,EUA). O material foi incubado por 24 horas a 35°C. Após o tempo de incubação as colônias foram submetidas a testes de triagem bioquímica.

Figura 5: *S. aureus* inoculados em meio seletivo



a. Tubos de caldo Giolitti e Cantoni contendo controle positivo (a esquerda), controle negativo (no meio) e controle do meio (a direita). 5b. Placa de Baird-parker inoculado com *S. aureus*

Fonte: rapidmicrobiology.

3.3.1 Testes de triagem bioquímica

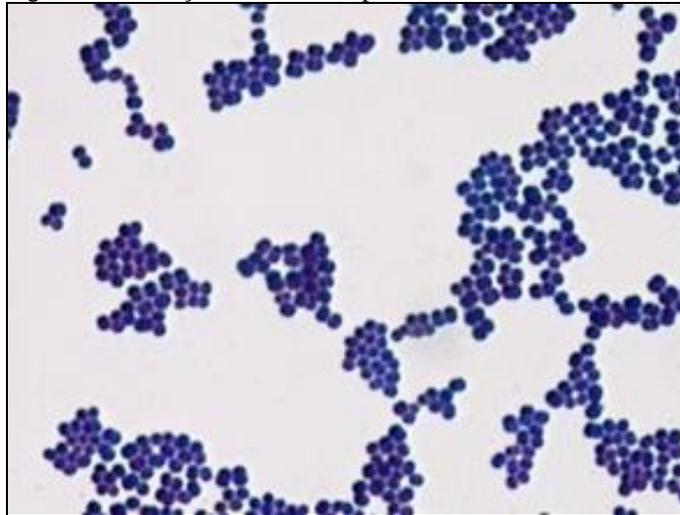
3.3.1.1 Coloração de Gram

Em uma lâmina de microscópio limpa e seca foi realizado um esfregaço do crescimento em ágar nutriente com adição de solução salina 0,85%. Após a secagem, o esfregaço foi fixado sob fogo e submetido à coloração de Gram. Primeiramente o esfregaço foi coberto com cristal violeta (0,02%) por 1 minuto e lavado em água corrente. Posteriormente foi adicionado lugol 0,01%) por 1 minuto e lavado em água corrente. O

esfregaço foi submetido ao contato durante três segundos com álcool-acetona (60%-40%) e posteriormente lavado com água corrente. Foi adicionada a solução de fucsina fenicada (0,06%) por 30 segundos e novamente lavado e seco. A lâmina foi levada a um microscópio óptico (OLYMPUS BH2) onde foram observadas as características morfológicas do esfregaço. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 12600 (Figura 6).

Foram consideradas como características, os esfregaços que apresentaram cocos Gram positivos, agrupados em forma de cachos.

Figura 6: Coloração de Gram. Cepa *S. aureus* ATCC 12600

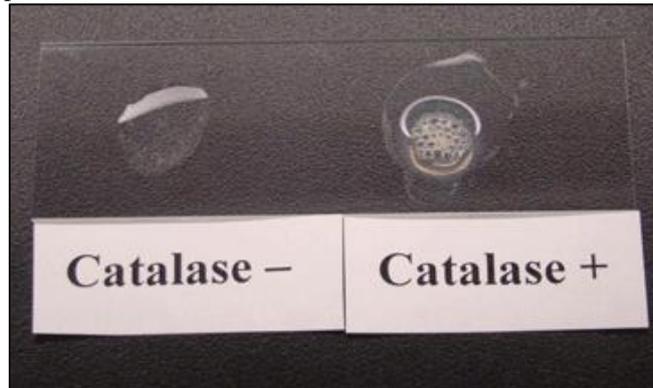


Fonte: examiner.com

3.3.1.2 Teste da catalase

Em uma placa de Petri vazia foi transferido uma pequena quantidade do crescimento com alça bacteriológica, ao qual foi adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (Figura 7). Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 12600 e como controle negativo foi utilizada a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 4083. Foram consideradas como características as colônias que apresentaram formação de bolhas.

Figura 7: Teste da catalase com a formação de bolhas na cepa positiva.



Fonte: CDC

3.3.1.3 Teste da coagulase

Para um tubo de ensaio 13x100 mm, foram transferidos 0,3 mL do crescimento do caldo BHI e adicionados 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA (BD, EUA). O tubo foi incubado a 35°C por 6 horas. Foi observada a formação de coágulo, sendo positiva a formação de coágulo de intensidade variando de fraca (1+) a forte (4+) (Figura 8). Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 12600 e como controle negativo cepa *Kocuria rhizophila* ATCC 9341. Foram consideradas como característicos, os isolados com coagulase positiva.

Figura 8: Tubo superior com exemplo de coagulação de plasma de coelho com EDTA. Tubo inferior controle negativo do teste.



Fonte: Interlabdist

3.4 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada no sistema Vidas (BioMérieux) que utiliza a técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), o protocolo de análise foi o *Easy Salmonella* - validação AOAC RI (N° 020901) e validação AOAC *Official Method of Analysis* (n° 2011.03). Foram pesados 25 gramas da amostra em uma bolsa plástica estéril Whirl-Pak (Nasco, EUA). Para o pré-enriquecimento foi adicionado um volume de 225 mL de água peptonada tamponada 1% e homogeneizado em aparelho Stomacher durante 60 s. O homogenato foi incubado a 35°C por 24 horas. Após a incubação, o pré-enriquecimento foi homogeneizado e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL do caldo de enriquecimento seletivo SX2. O caldo de enriquecimento seletivo foi incubado a 42 °C por 24 horas. Um volume de 0,5 mL da cultura foi transferido para uma barrete VIDAS SALMONELLA - SLM (BioMérieux). A barrete foi posicionada em banho seco a uma temperatura aproximada de 130 °C por 15 minutos, após esse tempo a barrete foi deixada em temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente a barrete foi introduzida no equipamento VIDAS. O caldo SX2 foi conservado a 2 - 8° C para uma eventual confirmação. Havendo a necessidade de confirmação, a pesquisa dará prosseguimento seguindo a metodologia descrita por Andrews, Jacobson e Hammack (2014).

3.5 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com a metodologia do BAM/FDA (HITCHIS; JINNEMAN, 2011). Foram pesados 25 gramas da amostra em uma bolsa plástica Whirl-Pak (Nasco, EUA) seguido da adição de 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (BLEB) (BD). A amostra foi homogeneizada em aparelho Stomacher durante 60 s. O homogenato foi incubado a 30°C por 4 horas. Após este período, foram adicionados os suplementos seletivos: 1,8 mL de solução de ácido nalidíxico a 0,5%, 0,455 mL de solução de acriflavina a 0,5% e 1,15 mL de solução de cicloheximida a 1%. O homogenato foi reincubado a 30°C por 20-44 horas. Após o período de incubação de 24 e 48

horas, uma alçada da cultura foi semeada em uma placa de ágar cromogênico para *Listeria*. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Como controle positivo, foi inoculada a cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e como controle negativo foi inoculada a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 4083. As placas que apresentaram crescimento de colônias verdes com halo (Figura 9) foram repicadas para ágar tripticaseína de soja com 6% de extrato de levedura (TSAYE) (BD) e incubadas a 35° C por 24 horas. Cada uma das colônias suspeitas foi submetida ao teste de hemólise em ágar sangue de carneiro. As colônias que apresentaram resultados positivos na hemólise foram submetidas à técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para confirmação molecular da espécie *L. monocytogenes*.

Figura 9: Cultura de *L. monocytogenes* em ágar cromogênico.



Fonte: arquivo pessoal

3.5.1 Confirmação das cepas isoladas por reação em cadeia da polimerase (PCR)

De cada colônia que apresentou hemólise característica foi realizada a extração de DNA com o kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL contendo: 2,5 µL de DNA molde (20-60 ng/µl), 25 pmol de cada iniciador (Quadro 1) (AB1/AB3) e PCR MasterMix 1X (ThermoScientific, EUA). A amplificação foi realizada no SimpliAmp ThermalCycler (Applied Biosystems, Singapore) nas seguintes condições: 94°C/3 min; 25 ciclos de 94°C/30 s, 62°C/30 s e 72°C/1 min; e extensão final a 72°C/5 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 V/50 min. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma, EUA) por 15 min e visualizado em analisador de imagens (GE-Healthcare, Inglaterra).

Quadro 1: Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Iniciadores	Sequência	Referência
AB1	CTTCAGGCGGATAGATTAGG	JUNG, 2001
AB3	TTCGCAAGTGAGCTTACGTC	

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de coliformes termotolerantes, das 30 amostras de queijo minas frescal analisadas, 20 amostras (66,7%) apresentaram resultado insatisfatório ($\geq 5 \times 10^2$ UFC.g⁻¹). A tabela 1 apresenta as diferentes faixas de contaminação encontradas nas amostras.

Tem sido relatada em vários trabalhos a presença de coliformes termotolerantes em amostras de queijo minas frescal. Em 2008, Santos e colaboradores obtiveram um percentual semelhante a este trabalho (62,5%) de amostras reprovadas no ensaio de coliformes termotolerantes em queijos minas frescal artesanais. Outros trabalhos como Brant et al (2007) em Minas Gerais, Salotti et al (2006) em São Paulo e Tomich et al (2001) em Belo Horizonte, obtiveram percentuais de reprovação mais elevados: 93%, 92% e 83,3%, respectivamente.

Tabela 1. Enumeração de coliformes termotolerantes em queijos minas frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro

Faixa de contagem	Número de amostras (%)	Limite da legislação
$\leq 10^2$ UFC.g ⁻¹	9 (30%)	5 x 10 ² UFC.g ⁻¹
$10^2 - 5 \times 10^2$	1(3,3%)	
$\geq 10^2 - \leq 10^3$ UFC.g ⁻¹	0 (0%)	
$\geq 10^3 - \leq 10^4$ UFC.g ⁻¹	3 (10%)	
$\geq 10^4$ UFC.g ⁻¹	17 (56,7%)	

Na contagem de estafilococos coagulase positiva, nenhuma amostra apresentou resultado acima do limite da legislação (5×10^2 NMP.g⁻¹), porém foram isoladas seis colônias que se apresentaram como cocos Gram positivos com resultado positivo no teste da catalase e da coagulase.. A tabela 2 apresenta os resultados das contagens encontrado nas análises.

Tabela 2. Resultados obtidos na contagem de estafilococos coagulase positiva nas amostras de QMF analisadas.

Amostra	Resultado NMP.g ⁻¹	Tubos confirmados			Amostra	Resultado NMP.g ⁻¹	Tubos confirmados		
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
QMF 1	≤ 3	0	0	0	QMF 16	9,2	2	0	0
QMF 2	≤ 3	0	0	0	QMF 17	3	0	1	0
QMF 3	≤ 3	0	0	0	QMF 18	≤ 3	0	0	0
QMF 4	≤ 3	0	0	0	QMF 19	≤ 3	0	0	0
QMF 5	3,6	1	0	0	QMF 20	≤ 3	0	0	0
QMF 6	≤ 3	0	0	0	QMF 21	≤ 3	0	0	0
QMF 7	≤ 3	0	0	0	QMF 22	9,2	2	0	0
QMF 8	≤ 3	0	0	0	QMF23	≤ 3	0	0	0
QMF 9	≤ 3	0	0	0	QMF24	≤ 3	0	0	0
QMF 10	≤ 3	0	0	0	QMF25	≤ 3	0	0	0
QMF 11	≤ 3	0	0	0	QMF26	≤ 3	0	0	0
QMF 12	≤ 3	0	0	0	QMF27	≤ 3	0	0	0
QMF 13	3,6	1	0	0	QMF28	≤ 3	0	0	0
QMF 14	≤ 3	0	0	0	QMF29	7,4	1	1	0
QMF 15	≤ 3	0	0	0	QMF30	≤ 3	0	0	0

NMP – Número mais provável, QMF – Queijo minas frescal

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita através do método automatizado imunoenzimático VIDAS (bioMérieux, França). Todas as 30 amostras apresentaram resultado satisfatório. Esse mesmo resultado foi obtido em outras pesquisas em queijo como as realizadas por Ávila e Gallo (1996) e Peresi et al (2001).

Na pesquisa de *L. monocytogenes*, quatro amostras de queijo minas frescal apresentaram contaminação pelo micro-organismo. *L. monocytogenes* possui uma grande capacidade de sobrevivência e de crescimento em queijos (JAKOBSEN et al, 2011; SCHVARTZMAN et al, 2011). Uma revisão feita por Carpentier e Cerf, em 2011, evidenciou a presença de *L. monocytogenes* em equipamentos industriais. Segundo Dias et al (2012) e Silva et al (2003), as condições de instalações encontradas em indústrias de queijo no Brasil também favorecem o crescimento e colonização de *L. monocytogenes* no ambiente e em equipamentos.

Vários estudos com queijos encontrados na literatura comprovam a ocorrência de *L. monocytogenes* nesses produtos. Cerqueira e colaboradores (1995) analisaram 103 amostras de queijo minas frescal e encontraram 3,33% das amostras com *L. monocytogenes*. Silva e colaboradores (1998) em um estudo feito com 30 amostras de queijos minas frescal (artesanais e industrializados), queijos do tipo Gorgonzola, Brie e Roquefort, obtiveram como resultado 10,67% das amostras positivas para *L. monocytogenes*.

Mais de 50% das amostras analisadas apresentaram resultado insatisfatório quanto a contagem de coliformes termotolerantes, destas amostras quatro foram insatisfatórias também pela presença de *L. monocytogenes*. Resultados superiores foram encontrados por Pereira e colaboradores (1999) que analisaram queijos minas frescal, canastra e padrão, que possuíam ou não o selo do Serviço de Inspeção Federal e encontraram 90% das amostras de queijo minas frescal com elevada contagem de coliformes termotolerantes não havendo distinção quanto a presença do SIF. Em nenhuma amostra foi identificada a presença de *Salmonella* spp. concordando com o resultado do presente trabalho. Resultados inferiores foram encontrados por Pirese e colaboradores (2001) que analisaram 30 amostras de queijo minas frescal industriale e encontraram 23,3% insatisfatórias quanto a presença de coliformes fecais e não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas.

Em um estudo mais recente, Apolinario e colaboradores (2014), analisaram 31 amostras de queijo minas frescal de laticínios da região da Zona da Mata mineira, fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), Estadual (SIE) e/ou Municipal (SIM). Como resultado obtiveram 54,8% das amostras insatisfatórias para coliformes termotolerantes, 16,12% das amostras estavam acima do limite permitido para estafilococos coagulase positiva e 9,6% das amostras apresentaram *L. monocytogenes*. A baixa ocorrência de amostras insatisfatórias para estafilococos coagulase positiva também foi encontrada por Zocche e colaboradores (2012), onde apenas três amostras de um total de 28 estavam fora dos padrões exigidos pela legislação. Com resultado semelhante, um estudo feito com queijos minas

frescal de Uberlândia- MG, não foram encontradas amostras com resultados insatisfatórios para estafilococos coagulase positiva, mas destacou a grande presença de estafilococos coagulase negativa, do qual algumas espécies são atualmente reconhecidas como potenciais produtores de enterotoxinas (GRANDI; ROSSI, 2006).

Outro resultado importante obtido no presente trabalho foi que duas amostras testadas (QMF 23 e 26) de uma mesma marca (marca B) e pertencentes ao mesmo lote, mas compradas em supermercados diferentes, obtiveram resultados distintos. A QMF 23 apresentou resultado insatisfatório para coliformes termotolerantes e *L. monocytogenes*, enquanto a QMF 26 foi satisfatória em todas as análises. Ambas as amostras foram analisadas no mesmo dia, ou seja, tiveram o mesmo tempo de prateleira até a data da análise. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada a heterogeneidade do lote ou a falhas nas condições de armazenamento no local de venda ou no transporte.

A tabela 3 apresenta um resumo das marcas (A-S) e o total de amostras analisadas por marca, incluindo a porcentagem de resultados insatisfatórios e o parâmetro de reprovação. É importante salientar que o percentual não é representativo do todo, pois algumas marcas tiveram mais de uma amostra analisada.

O tempo de validade de todas as amostras era em média de 30 dias, porém houve uma maior ocorrência de amostras insatisfatórias após 10 dias da data de fabricação. Um estudo feito por Sangaletti e colaboradores (2009) selecionou uma marca para avaliação de três lotes durante o período de validade. As amostras foram compradas diretamente do laticínio, o que eliminou as possíveis variações de estocagem em supermercados. Apenas um lote após o final do período de 30 dias da validade apresentou resultado insatisfatório. A pesquisa também avaliou outras cinco marcas, que foram eliminadas do estudo por já apresentarem resultado insatisfatório na análise previa dos produtos.

Tabela 3: Relação das amostras analisadas por marca, resultados e porcentagem de insatisfatoriedade.

Marcas	Total de Amostras	Amostras Satisfatórias	Amostras Insatisfatórias para Coliformes Termotolerantes	Amostras Insatisfatórias para <i>L. monocytogenes</i>	Porcentagem de Amostras Insatisfatórias
A	1	1	0	0	0%
B	5	2	3	1	60%
C	3	1	2	0	66,6%
D	2	0	2	1	100%
E	1	1	0	0	0%
F	1	0	1	0	100%
G	1	1	0	0	0%
H	1	0	1	0	100%
I	2	0	2	0	100%
J	1	1	0	0	0%
K	1	1	0	0	0%
L	1	0	1	0	100%
M	2	0	2	0	100%
N	1	0	1	0	100%
O	3	0	3	2	100%
P	1	1	0	0	0%
Q	1	0	1	0	100%
R	1	1	0	0	0%
S	1	0	1	0	100%

Em outro estudo elaborado por Carvalho, Viotto e Kuaye (2007), 97 amostras de queijo minas frescal produzidos por diferentes processos tecnológicos foram analisadas. As amostras foram adquiridas em supermercados, com variações do tempo de prateleira e estocagem. As amostras foram avaliadas conforme os critérios da legislação (BRASIL, 2001). Como resultado, 29% das amostras foram insatisfatórias para coliformes fecais, 12,9% para estafilococos coagulase positiva e 3,2% apresentaram crescimento de *L. monocytogenes*.

Assim como no presente trabalho, nenhuma amostra apresentou resultado positivo para presença de *Salmonella* spp. Esses dois estudos corroboram na hipótese de que o tempo de armazenamento e transporte possuem forte influência na qualidade microbiológica do queijo minas frescal.

O registro no serviço de inspeção exige que sejam implantados nas fábricas de alimentos programas de Boas Práticas de Fabricação e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), além da revisão periódica desses programas, que possuem como finalidade evitar falhas e possibilidade de contaminação dos produtos durante a produção (BRASIL, 1997, 1998).

5 CONCLUSÕES

- ✓ 66,7% das amostras foram insatisfatórias para contagem de coliformes termotolerantes o que caracteriza falta de monitoramento nos procedimentos de produção;
- ✓ Em 13,4% das amostras foi identificada a presença de *L. monocytogenes* e confirmadas através da técnica de PCR;66,7% das amostras não estavam em conformidade com a legislação vigente.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I.P.S.; RODRIGUES, M.A.M. Qualidade microbiológica do queijo tipo Mussarela Artesanal comercializada em Uberlândia- MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.22, n.162, p.101, jun. 2008.

ALEXANDRE, D.P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, n.4, on-line, 2002.

ALMEIDA, P.M.P.; FRANCO, R.M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e Coliformes Fecais. **Higiene Alimentar**, v.17, n.11, p.79-85, 2003.

ANDREWS, W. H., JACOBSON, A., HAMMACK, T. *Salmonella*. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Manual Online; FDA, 2011, Chapter 5. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>>. Acesso em agosto de 2014.

APOLINÁRIO, T.C.C.; SANTOS, G.S.; LAVORATO, J.A.A. Avaliação da qualidade microbiológica do Queijo minas frescal produzido por Laticínios do estado de minas gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

AQUINO, A.A. et al. Efeito de níveis crescentes de uréia na dieta de vacas leiteiras sobre a composição e rendimento de fabricação de queijos minas frescal. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.46, n.4, p.273-279, 2009.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**. v.53, n. 1, p. 159- 163, 1996.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº 146, de 07/03/96. Diário Oficial da União, **Brasília**, 11/03/96, seção I, p. 3977-3986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 Jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA. **São Paulo**, 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf> . Acesso em: 05 jan. 2016.

BRASIL. Portaria no 326, de 30 de julho de 1997, do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1 ago. 1997. Seção 1, p.16560-16563.

BRASIL. Portaria no 46, de 10 de fevereiro de 1998. O Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 mar. 1998. Seção 1, p.24.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food Industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145 p. 1–8, 2011.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CDC. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodnet/trends/2014/number-of-infections-by-year-1996-2014.html#table2a>> . Acesso em: 15 out. 2015.

CERQUEIRA, M. M. O. P et al. Frequência de *Listeria* sp e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: **CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XIII.**, 1 995, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, p. 95-7, 1995.

CHALITA, M. A. N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijo no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 6, p. 78-87, 2009.

DIAS, M.A.C. et al. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unit of mozzarella cheese in Brazil. **Food Control**, v. 24 , p. 199-205, 2012.

FEITOSA, T. ; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. Pesquisa de *Salmonella sp*, *Listeria sp* e micro-organismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23. suppl., p. 162-165, 2003.

FENG, P. et al. Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. In: Bacteriological analytical manual online. FDA, 2002. Chapter 4. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>> . Acesso em: 05 jan. 2016.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2ª ed., 607p., 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. 2005.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela; 2003.

HAZELWOOD, D.; MCLEAN, A. C. **Manual de Higiene para Manipuladores de Alimentos**. São Paulo: Varela, 140 p.1994.

HITCHINS, A.D.; JINNEMAN, K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food. In: **Bacteriological analytical manual Online**. [S.l]; FDA, 2011, chapter 10. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>. Acesso em: agosto 2014.

INTERNATIONAL STANDARD - ISO 6888-3. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 3: Detection and MPN technique for low numbers. ISO 6888-3. Switzerland: Geneva ISO, 11p. 2003.

ISEPON, J. S.; SANTOS, O.A.; SILVA, M.A.P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira - SP. **Revista Higiene Alimentar**. v.17, n. 106, p. 89-94. 2003.

JAKOBSEN, R. A. et al. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2011.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed, 712p., 2005.

JUNG, Y. Detection of *Listeria monocytogenes* using genetic and Immunological tools. Athens, Georgia, 2001.

JURGENSEN, C.A.; JURGENSEN, L.D. Passivação do cobre, alternativa para obtenção de condição de anaerobiose. **Revista Brasileira de Patologia clínica**, v.18, n.3, 1982

MIRAGAIA, M. Análise feita com queijo minas frescal revela salto de qualidade. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 03 jun. 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/comida/2013/07/1305014-analise-feita-com-queijo-minas-frescal-revela-salto-de-qualidade.shtml>> Acesso em: 06 ago. 2015.

OLIVEIRA, C.A.F et al. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e Mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.31-35, 1998.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Qualidade do leite no processamento de derivados. **Higiene e Vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, parte 5, p.91-102, 2001.

OLIVEIRA, D.F.; BRAVO, C.E.C.; TONIAL, I.B. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 621-623, 2012.

PEREIRA, M.L. et al. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n.5, p. 427-431, 1999.

PERESI, J.T.M. et al. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Revista Higiene alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PIETROWSKI, G. A. M. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 2, n. 2, p. 25-31, 2008.

GRANDI, A.Z.; ROSSI, D.A. qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG. In: **ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 6., 2006, Uberlândia-MG. Anais.Uberlândia, 2006.

SALOTTI, B.M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.262-269, 2009.

SANTOS, M. et al. Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do município de Guarapuava e Região. In: **SALÃO DECULTURA E EXTENSÃO**, 2008, Guarapuava-PR. Anais. Guarapuava, 2008.

SCHVARTZMAN, M. S. et al. Modeling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 31-38, 2011.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E. TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection, Des Moines**, v. 61 , n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SILVA, I. M. M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, L.F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu; 2004.

TOMICH, R.G.P.; TOMICH, T.R.; ORNELAS, E.A. Qualidade microbiológica de queijo Minas utilizado como matéria-prima na fabricação de pão de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.56, p.62-68, 2001.

VISA-SC. Doença transmitida por alimento (DTA). **Vigilância Sanitária**. Florianópolis. Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta>>. Acesso em: 06 ago. 2015.

WHO/ EUROPE. Data and statistics. Disponível em: < <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/data-and-statistics>> . Acesso em: 05 jan. 2016.

ZOCHE, F. et al. Estafilococos coagulase positiva em queijos minas frescal e minas padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. **B.CEPPA**, v. 30, n. 1, p. 119-124, 2012