

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” – FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL
PRODUZIDO NA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS,
BRASIL**

Milena Souza Reis

Bióloga

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” – FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL
PRODUZIDO NA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS,
BRASIL**

Discente: Milena Souza Reis

**Orientador: Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino
Coorientadora: Profa. Dra. Marita Vedovelli Cardozo**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária.**

Reis, Milena Souza

R375s Staphylococcus aureus em queijo Minas Artesanal produzido na Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. / Milena Souza Reis. -- Jaboticabal, 2025

55 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Queijo. 2. Microbiologia. 3. Artesanal. 4. Alimentos. 5. Resistência Bacteriana. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo avaliou a qualidade microbiológica de queijos Minas Artesanais da Serra da Canastra, comparando propriedades com e sem certificação ARTE. Foram analisadas amostras em diferentes etapas, investigando patógenos, resistência bacteriana e perfil genético. *Staphylococcus aureus* foi detectado apenas em produtos não certificados, enquanto *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* não foram encontrados. Em relação a Enterobacteriaceae, os isolados obtidos apresentaram resistência intrínseca, e *S. aureus* mostrou baixa resistência, sem o gene *mecA*. Os resultados indicam que o selo ARTE contribui para práticas sanitárias mais eficazes e pode ser usado como ferramenta de monitoramento da qualidade microbiológica.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study assessed the microbiological quality of *Minas Artesanal* cheeses from the Serra da Canastra region, comparing products with and without the ARTE certification seal. Samples were analyzed at different production stages to investigate pathogens, bacterial resistance, and genetic profiles. *Staphylococcus aureus* was detected exclusively in non-certified products, whereas *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were not identified in any samples. Regarding *Enterobacteriaceae*, the isolates exhibited intrinsic resistance, while *S. aureus* showed low resistance and did not harbor the *mecA* gene. The findings suggest that the ARTE certification promotes more effective sanitary practices and may serve as a reliable tool for monitoring the microbiological quality of artisanal cheeses.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, BRASIL

AUTORA: MILENA SOUZA REIS

ORIENTADOR: RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

COORIENTADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MARITA VEDOVELLI CARDOZO**
Data: 05/09/2025 16:39:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **SARAH REGINA VARGAS**
Data: 05/09/2025 16:55:30-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. SARAH REGINA VARGAS (Participação Virtual)
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) / Passos/MG

Documento assinado digitalmente
 **LILIAN CRISTINA MAKINO**
Data: 05/09/2025 17:35:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / FCAVR UNESP Registro

Jaboticabal, 05 de setembro de 2025

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MILENA SOUZA REIS – Nasceu em 16 de janeiro de 2001, no município de Alpinópolis, estado de Minas Gerais. Em março de 2019 ingressou no curso de Ciências Biológicas Licenciatura na Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Passos, e recebeu o título de Licenciada em Ciências Biológicas em 12 de maio de 2023. Em 07 de agosto de 2023 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária nível de Mestrado Acadêmico na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV / UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP.

*"Nada na vida deve ser temido,
apenas compreendido. Agora é hora
de compreender mais, para que
possamos temer menos."*

(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu sustento em todo tempo, que me guiou na incerteza e renovou minhas forças quando pensei em desistir. Suas promessas nunca falham.

Aos meus pais, por seu amor e confiança constantes. Obrigada por valorizarem minha educação e me ensinarem que esforço transforma sonhos em realidade.

Ao meu irmão, minha maior motivação. É por ele que busco ser melhor e retribuir com tudo o que houver de melhor em mim.

Ao meu esposo, pelo amor, paciência e compreensão em cada etapa desta jornada. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins, por acreditar em mim até quando eu duvidava, e por me lembrar todos os dias de que eu sou capaz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino, agradeço pelas contribuições e pelo conhecimento compartilhado ao longo deste trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Marita Vedovelli Cardozo, agradeço profundamente pela oportunidade, incentivo e apoio constantes. Seu suporte foi essencial, e sua amizade e generosidade me sustentaram mais do que qualquer palavra poderia expressar.

Aos membros da banca pelas contribuições valiosas e por enriquecerem este momento tão importante da minha trajetória acadêmica.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária (PPG–MICRO) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), pela oportunidade e estrutura oferecida para a realização deste mestrado.

Ao Prof. Dr. Caio Roberto Soares Bragança, pelo apoio e pela disponibilização do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (LABFIS – UEMG), fundamentais para a realização das análises microbiológicas.

Aos colegas do Laboratório BIOBAC, que passaram de companheiros de pesquisa a amigos essenciais, meu muito obrigada. Obrigada por acolherem minha vulnerabilidade, darem força nos momentos difíceis e compartilharem desta conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas.....	vi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Produção de Queijo.....	2
2.2. Queijo Artesanal e Industrial e Etapas de Produção.....	4
2.3. Legislações do queijo no Brasil.....	6
2.4. Principais microrganismos em alimentos.....	11
2.5. Queijos e Doenças Transmitidas por Alimentos.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivo Específico.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Coleta de amostras.....	15
4.2. Quantificação microbiológica.....	16
4.3. Cultivo microbiológico para detecção de patógenos.....	16

4.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.3.2. <i>Salmonella</i> spp.....	17
4.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	17
4.4. Extração de DNA.....	18
4.5. Confirmação genética de patógenos.....	18
4.5.1. PCR de Triagem.....	18
4.5.2. PCR confirmatória e isolamento.....	19
4.6. Testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	20
4.6.1. Triagem em meio seletivo com antibiótico.....	20
4.6.2 Teste de difusão em disco.....	20
4.7 Detecção genética de resistência e virulência em <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.8 Similaridade genética.....	22
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Quantificação microbiológica.....	22
5.2. Detecção de patógenos.....	24
5.3. Testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	24
5.3.1. Triagem em meio seletivo com antibiótico.....	24
5.3.2. Teste de difusão em disco.....	25
5.3.3. Detecção de genes de resistência e virulência.....	27
5.4. Similaridade genética.....	27
6. DISCUSSÃO.....	28
7. CONCLUSÕES.....	31
8. REFERÊNCIAS.....	32

***Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA
SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, BRASIL**

RESUMO – Os queijos artesanais com selo ARTE podem ser comercializados em todo o território nacional e são produzidos conforme padrões de qualidade definidos por regulamentação específica. Em contrapartida, queijos sem essa certificação têm sua comercialização restrita ao âmbito municipal ou estadual, mediante registro em serviços de inspeção. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas Artesanais produzidos na Serra da Canastra, Minas Gerais, comparando amostras oriundas de propriedades com e sem o selo ARTE. Foram analisadas 69 amostras, incluindo leite cru, leite pasteurizado, massa, queijo e *swab* das formas, provenientes de 16 propriedades (oito certificadas e oito não certificadas). As análises microbiológicas incluíram a quantificação de microrganismos indicadores; identificação de patógenos por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR); avaliação da susceptibilidade fenotípica a antimicrobianos por triagem em meio seletivo com antibiótico e teste de difusão em disco; e análise da similaridade genética de isolados de *Staphylococcus aureus* por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Não foram detectadas *Salmonella* spp. nem *Listeria monocytogenes*. Propriedades com o selo ARTE apresentaram maior frequência de amostras com contagens acima dos limites legais para Enterobacteriaceae (53,1%) e Estafilococos Coagulase Positiva (43,8%), quando comparadas às propriedades sem certificação (32,4% e 21,6%, respectivamente). No entanto, todos os isolados de *Staphylococcus aureus* foram identificados exclusivamente em propriedades não certificadas. Foi observada resistência à oxacilina em 4,35% dos isolados de *S. aureus* e à ceftazidima em 14,49% das *Enterobacteriaceae*. Conclui-se que o selo ARTE pode contribuir para práticas sanitárias mais eficazes e maior segurança microbiológica dos queijos artesanais.

Palavras-chave: certificação sanitária; queijo artesanal; microrganismos indicadores; resistência bacteriana.

***Staphylococcus aureus* IN ARTISANAL MINAS CHEESE PRODUCED IN SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, BRAZIL**

ABSTRACT – Artisanal cheeses bearing the ARTE seal are authorized for nationwide commercialization in Brazil and are produced in accordance with specific regulatory quality standards. In contrast, cheeses without this certification may only be sold within municipal or state boundaries, provided they are registered with local inspection services. This study aimed to evaluate the microbiological quality of Minas Artisanal Cheeses produced in the Serra da Canastra region, Minas Gerais, by comparing samples from farms with and without the ARTE seal. A total of 69 samples were analyzed, including raw milk, pasteurized milk, curd, cheese, and surface *swabs* from cheese molds, collected from 16 farms (eight certified and eight non-certified). Microbiological analyses included quantification of indicator microorganisms; pathogen detection through both culture and polymerase chain reaction (PCR); phenotypic antimicrobial susceptibility testing via selective media screening with antibiotics and disk diffusion assay; and genetic similarity analysis of *Staphylococcus aureus* isolates using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). No *Salmonella spp.* or *Listeria monocytogenes* were detected. Certified farms (ARTE seal) had a higher proportion of samples exceeding legal limits for *Enterobacteriaceae* (53.1%) and coagulase-positive staphylococci (43.8%) compared to non-certified farms (32.4% and 21.6%, respectively). However, all *S. aureus* isolates were exclusively found in samples from non-certified farms. Oxacillin resistance was observed in 4.35% of *S. aureus* isolates, and ceftazidime resistance was detected in 14.49% of *Enterobacteriaceae* isolates. These findings suggest that the ARTE seal may contribute to improved sanitary practices and enhanced microbiological safety in artisanal cheese production.

Keywords: sanitary certification, artisanal cheese, indicator microorganisms, bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma do protocolo de isolamento e identificação bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i>	19
Figura 2. Propriedades e número total de amostras que excederam os limites da legislação para contagens de Estafilococos coagulase positiva de acordo com a Instrução Normativa Nº 161 da ANVISA.....	23
Figura 3. Distribuição percentual da suscetibilidade antimicrobiana, determinada pelo teste de difusão em disco, de <i>Staphylococcus aureus</i> (A), Enterobacteriaceae (B) isolados de amostras de leite cru, pasteurizado, massa e queijo, durante a produção do queijo Minas Artesanal na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.....	26
Figura 4. Dendrograma gerado pela comparação dos padrões de bandas no PFGE de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de leite cru e massa de queijo. A construção foi realizada utilizando o método de agrupamento UPGMA no software BioNumerics 7.5, com coeficiente de dados e otimização fixados em 1%. Foi aplicado o corte de similaridade PFGE de 90% (linha vermelha tracejada).....	27

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Primers das reações de PCR utilizadas.....	21
Tabela 2. Contagem detalhada de Enterobacteriaceae em leite pasteurizado e de Estafilococos totais em massa, queijo e <i>swab</i> da forma.....	23
Tabela 3. Isolados de Enterobacteriaceae resistentes à ceftazidima, identificados por MALDI-TOF, e isolados de <i>S. aureus</i> resistentes à oxacilina, obtidos de diferentes propriedades e origens.....	25

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui mais de 36 variedades de queijos artesanais, cuja classificação varia conforme o uso de leite cru ou pasteurizado e dos métodos de dessoragem, prensagem e maturação, associados à região de origem (Chaves et al., 2021). Em Minas Gerais, principal polo produtor do país, o Queijo Minas Artesanal (QMA) se destaca, com uma produção anual de 78.219 toneladas, provenientes principalmente de microindústrias rurais (IBGE, 2017). Seu perfil sensorial é determinado por fatores climáticos e pela microbiota local, resultando em variações entre queijos de microrregiões como Serra da Canastra, Serro e Araxá, mesmo quando produzidos com técnicas semelhantes (Monteiro et al., 2018).

Queijos artesanais, produzidos sem pasteurização, são valorizados pelo sabor característico, influenciado pela presença de bactérias ácido-láticas (BAL) (Yoon et al., 2016). Embora essas bactérias possam contribuir para a inibição de patógenos, há relatos de surtos de doenças alimentares associados ao consumo de queijos e leite não pasteurizados, com a presença de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (Centers for Disease Control and Prevention, 2017; Jackson et al., 2018; Johler et al., 2015a, 2015b; Robinson et al., 2020; Ung et al., 2019).

Além do risco microbiológico, os alimentos de origem animal podem desempenhar um papel na disseminação de genes de resistência a antibióticos (ARGs) e bactérias resistentes (ARBs) ao longo da cadeia alimentar (EFSA, 2009; Titouche et al., 2022). A presença de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) tem sido relatada na cadeia produtiva de laticínios (da Silva et al., 2020; Gelalcha e Dego, 2022). Essa resistência bacteriana está frequentemente associada ao uso indiscriminado de antibióticos na medicina e na agropecuária, bem como à contaminação ambiental (Bava et al., 2024).

Diante desses desafios, normativas e regulamentações foram implementadas visando garantir a segurança sanitária dos queijos artesanais. O Selo ARTE, estabelecido pela Lei nº 13.680/2018, juntamente com a Lei nº 13.860/2019 e a Instrução Normativa Nº 161, define padrões microbiológicos e procedimentos de

controle para esses produtos. Para leites pasteurizados, é exigido que, em um lote de cinco amostras, nenhuma apresente mais de 10^1 UFC/mL de Enterobacteriaceae. Para queijos, nenhuma das cinco amostras deve conter enterotoxinas estafilocócicas ou *Salmonella* spp. Além disso, em queijos com umidade inferior a 46%, até duas amostras das cinco podem apresentar Estafilococos coagulase positiva entre 10^2 e 10^3 UFC/g. (Brasil, 2022a; Brasil, 2019a; Brasil, 2018). Minas Gerais tem desempenhado papel central na regulamentação da produção, com legislações estaduais como a Lei nº 23.157/2018 e o Decreto nº 48.024/2020, que estabelecem requisitos específicos para a fabricação do queijo artesanal com leite cru integral (Minas Gerais, 2020a; Minas Gerais, 2018).

Sendo assim, esta pesquisa avaliou a presença de microrganismos indicadores e patogênicos, bem como investigou o perfil de resistência bacteriana em queijos do tipo Minas Artesanal, produzidos em propriedades com e sem selo ARTE, na região da Serra da Canastra, em Minas Gerais, Brasil. Além disso, os resultados microbiológicos dos queijos certificados e não certificados foram comparados, com o intuito de identificar possíveis diferenças na qualidade microbiológica entre os dois grupos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção de Queijo

A produção de queijo artesanal no Brasil possui um relevante contexto histórico. Seu surgimento remonta ao período colonial, entre os séculos XVI e XIX, com a chegada dos portugueses que importaram técnicas de produção originárias da região da Serra da Estrela, em Portugal (Meneses, 2006). Ao longo dos anos, essas técnicas foram gradualmente refinadas e aprimoradas pela população, culminando na criação do queijo artesanal contemporâneo.

Assim, a produção de queijo disseminou-se por todo o território nacional, destacando-se, atualmente, os estados de Minas Gerais, Goiás, Pernambuco, São

Paulo e Espírito Santo, de forma sequencial, quanto ao volume de produção de queijo nas agroindústrias rurais do Brasil (IBGE, 2017).

O estado de Minas Gerais é um líder incontestável na produção de queijo artesanal no Brasil, registrando uma produção anual de 78.219 toneladas, originadas principalmente de agroindústrias rurais, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). Em decorrência desse fato, Minas Gerais destaca-se como o epicentro do comércio de queijos artesanais no país. Como resposta a essa posição de destaque, o estado tem adotado uma abordagem proativa na formulação de políticas públicas e regulamentações, em estreita colaboração com a legislação federal, com o objetivo de assegurar a viabilidade e a segurança sanitária dos produtos alimentícios destinados ao mercado (Monteiro et al., 2018).

O estado de Goiás ocupa o segundo lugar na produção de queijos no Brasil, com uma produção anual de 17.334 toneladas, representando 77,84% a menos do que a produção de Minas Gerais, de acordo com dados do IBGE (IBGE, 2017).

A redução na produção em Goiás pode ser atribuída a desafios relacionados à infraestrutura, notadamente a coleta de leite, disponibilidade de energia elétrica e a eficiência na coleta de leite por quilômetro. A entrega frequente do leite às agroindústrias produtoras é crucial devido à perecibilidade do produto, resultando em custos de frete significativos em comparação com o valor de mercado do litro de leite (Bernardes, 2022).

No cenário brasileiro de produção de queijos, Pernambuco assume uma posição proeminente como o terceiro maior estado produtor, gerando anualmente 16.244 toneladas de queijo artesanal, conforme dados do IBGE (IBGE, 2017). O queijo coalho é a variedade de queijo mais produzida neste estado, e esse destaque se justifica pela sua versatilidade na culinária, sendo amplamente consumido em sua forma natural, assada ou como ingrediente fundamental em pratos regionais que vão desde os mais simples até os mais sofisticados, principalmente na região nordestina, como indicado por (Neto, 2016).

E em seguida, no *ranking* de produção de queijo nacional, o terceiro e o quarto lugares são ocupados por São Paulo e Espírito Santo, que, em 2017, registraram uma produção anual de 12.030 e 10.085 toneladas de queijo, respectivamente, de acordo com dados do IBGE.

As variações nos queijos produzidos nesses diferentes estados, mesmo com técnicas semelhantes, resultam de influências notáveis, principalmente do ambiente de produção. O termo "*terroir*" abrange as particularidades locais, condições climáticas, características do rebanho e outros fatores que desempenham um papel fundamental na definição das propriedades distintivas de cada queijo (Chaves et al., 2021).

2.2. Queijo Artesanal e Industrial e Etapas de Produção

O Brasil apresenta uma ampla diversidade de características na produção de queijos, resultantes das distintas técnicas empregadas no processamento desses produtos. Essas variações englobam a utilização de leite cru ou pasteurizado, métodos de dessoragem, prensagem manual, presença de massa cozida, maturação ou ausência dela, entre outras particularidades. Estas características não apenas conferem identidades específicas a cada tipo de queijo, como queijo colonial, queijo coalho, queijo minas artesanal, entre outros, mas também determinam se eles são classificados como artesanais ou industrializados (Chaves et al., 2021).

O Queijo Artesanal tipo Minas (QMA) é uma variedade de renome no Brasil, especialmente notável pela sua produção predominante no estado líder da produção nacional de laticínios, Minas Gerais. O sabor deste queijo varia de acordo com as características climáticas do local de produção e a presença de microrganismos naquele ambiente. Mesmo em Minas Gerais, queijos produzidos em diferentes regiões, como Serra da Canastra, região do Serro e Araxá, apresentam distintos sabores, apesar do emprego da mesma técnica de produção em todas essas microrregiões tradicionais (Monteiro et al., 2018).

A produção de queijos artesanais segue padrões rigorosos, com cada etapa na produção determinada por um período específico para sua realização. Segundo Monteiro et al. (2020), ocorre geralmente da seguinte maneira: na primeira etapa realiza-se a filtragem do leite na chegada à queijaria, utilizando uma malha fina de plástico. Na segunda etapa, o "pingo" e o coalho são adicionados ao leite filtrado.

Este "pingo" consiste no soro separado da massa de outro queijo produzido no dia anterior, contendo uma elevada concentração de bactérias lácticas endógenas e cloreto de sódio, servindo como um inóculo de fermentação (Furtado, 1980). O coalho representa um coagulante enzimático amplamente empregado em aplicações comerciais, sendo dosado de maneira precisa para promover a coagulação do leite (Monteiro et al., 2018).

O terceiro estágio é a coagulação, no qual ocorre a formação da massa no tanque de produção. Em seguida, essa massa é cortada ou quebrada e agitada para permitir a dessoragem, que é o processo de separação e remoção do soro usando utensílios higienizados. Após a dessoragem, a massa é moldada em recipientes de polietileno e compactada manualmente. Após a compactação, a massa é superficialmente salgada, desenformada e, assim, o queijo é finalizado. Em seguida, ele passa por um processo de ralação para remover imperfeições superficiais e é submetido ao processo de cura, também chamado de maturação (Monteiro et al., 2018).

A maioria dos queijos artesanais segue o padrão de processamento descrito acima, mas devido às suas características específicas, variações podem ocorrer em relação à técnica de dessoragem (total ou parcial), maturação, prensagem (manual ou mecânica, com ou sem pano), lavagem (com água e leite) e salga da massa, entre outros fatores cruciais que definem cada variedade de queijo artesanal (Chaves et al., 2021).

O queijo industrializado e o queijo artesanal seguem processos similares, com a distinção de que o leite utilizado na produção industrial passa por pasteurização. Conforme mencionado por Tadjine et al. (2020), esse processo envolve o aquecimento controlado do leite por um tempo e a uma temperatura específicos, visando a eliminação de microrganismos patogênicos, preservando a qualidade do produto final e mitigando os riscos de doenças transmitidas por alimentos, em benefício da saúde do consumidor.

O queijo produzido de forma artesanal, sem a etapa de pasteurização, possui um paladar mais intenso devido à comunidade microbiana que o caracteriza. Por essa razão, é frequentemente a escolha preferencial dos consumidores em comparação ao queijo feito a partir de leite pasteurizado. Contudo, é relevante destacar que, embora

as bactérias lácticas demonstrem eficácia na supressão de patógenos, há registros de surtos de doenças alimentares relacionados ao consumo de queijos elaborados a partir de leite não pasteurizado, suscitando inquietações quanto à segurança alimentar (Yoon et al., 2016).

Por essa razão, surgiu a necessidade de estabelecer legislações específicas para a produção e comercialização de queijos no Brasil, visando garantir a segurança alimentar e a viabilidade microbiológica do produto para o consumo. Isso envolve o controle quantitativo e qualitativo dos microrganismos presentes nos produtos lácteos de origem animal, assegurando que o alimento chegue à mesa do consumidor em condições adequadas.

2.3 Legislações do queijo no Brasil

Na década de 1950, desde a promulgação da Lei Nº 1.283 em 18 de dezembro de 1950, que estabeleceu as diretrizes para a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, o Brasil centralizou suas preocupações na fiscalização de produtos de origem animal, sendo eles destinados ao consumo humano ou não, independentemente do acréscimo de produtos vegetais, onde essa abrangência contemplava produtos tanto *in natura* quanto processados, manipulados, armazenados, depositados ou em trânsito (Brasil, 1950). Este evento representa um marco significativo no avanço subsequente da legislação acerca de produtos de origem animal no contexto brasileiro, porém com um enfoque particular na produção industrial.

Em 1952, foi promulgado o Decreto Nº 30.691 de 29 de março, que aprovou o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (Brasil, 1952). Este regulamento tinha como principal objetivo garantir a inocuidade, identidade, qualidade e integridade dos produtos de origem animal, bem como a segurança do consumidor. A fiscalização era conduzida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nos estabelecimentos registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF) (Brasil, 1952). No ano de 1989, foi promulgada a

Lei Nº 7.889, datada de 23 de novembro, que complementou a lei anterior e representou uma legislação contemporânea relativa à inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, abordando de forma mais abrangente questões de saúde pública e regulamentação sanitária (Brasil, 1989).

O Brasil alcançou um marco significativo no aprimoramento da inspeção e fiscalização de queijos nacionais com a promulgação do Decreto nº 5.741 em 30 de março de 2006 (Brasil, 2006). Esse decreto regulamentou a Lei nº 8.171 de 17 de janeiro de 1991, que havia sido posteriormente alterada pela Lei 9.712 de 20 de novembro de 1998 (Brasil, 1998) para acrescentar dispositivos referentes à defesa agropecuária, estabelecendo as bases para a organização do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, conhecido como SUASA e o Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal, conhecido como SISBI-POA.

Nesse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu um sistema nacional destinado a promover a saúde pública por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal, o SISBI-POA. Esse sistema ampliou o mercado de alimentos previamente regulamentados pelos Serviços de Inspeção Municipal (SIM) e Serviços de Inspeção Estadual (SIE), possibilitando a comercialização nacional desses produtos, desde que cumprissem os critérios estabelecidos pelo sistema (Brasil, 2006).

O Decreto número 5.741, datado de 30 de março de 2006, referente à estruturação do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), previa que a conformidade com o Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-POA) demandaria dos entes federativos a formulação de diretrizes operacionais voltadas à regulamentação de estabelecimentos menores. Porém, é importante observar que a abordagem logística dessas regulamentações, incluindo o mencionado decreto e outras legislações correlatas, tem um foco predominantemente agroindustrial, fundamentado na consideração do processamento de alimentos e na garantia de sua segurança sanitária (Brasil, 2006). Em 2015, o Decreto nº 8.471, datado de 22 de julho, foi emendado para reconhecer estabelecimentos agroindustriais envolvidos na produção de bebidas e produtos de origem animal como agroindústrias artesanais, considerando a importância do contexto tradicional na fabricação desses produtos (Brasil, 2015).

Em 2017, foi promulgado o Decreto nº 9.013, emitido em 29 de março, com objetivo de regulamentação da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), revogando o Decreto nº 30.691, datado de 29 de março de 1952 e atualmente regulamentando as Leis nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950 e nº 7.889 de 23 de novembro de 1989 (Brasil, 2017). O decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, em conjunto com a Instrução Normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013, estabelecem várias regulamentações relacionadas à maturação de queijos. A Instrução Normativa nº 30, por sua vez, traz uma alteração significativa em relação à segurança dos queijos, permitindo a redução do tempo de maturação sob as seguintes condições (Brasil, 2013):

Art. 1º Permitir que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnicos-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.

§ 1º A definição de novo período de maturação dos queijos artesanais será realizada após a avaliação dos estudos pelo órgão estadual e/ou municipal de inspeção industrial e sanitária reconhecidos pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal - SISBI/POA.

§ 2º Para efeito de comércio internacional deverão ser atendidos os requisitos sanitários específicos do país importador.

Art. 2º A produção de queijos elaborados a partir de leite cru, com período de maturação inferior a 60 (sessenta) dias, fica restrita a queijaria situada em região de indicação geográfica registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, de acordo com o disposto no Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controladas para brucelose e tuberculose pelo Órgão Estadual de Defesa Sanitária Animal, no prazo de até três anos a partir da publicação desta Instrução Normativa, sem prejuízo das demais obrigações dispostas em legislação específica.

Apesar do processo via SISBI-POA, a maioria das regulamentações ainda possuía um caráter predominantemente industrial, inadequado para satisfazer as demandas dos produtores de pequenas agroindústrias artesanais. Diante da evolução

dos padrões alimentares da sociedade e do crescente interesse por produtos artesanais, orgânicos e tradicionais, tornou-se imprescindível a implementação de uma legislação abrangente que considerasse essas particularidades dos produtos. Dessa forma, em 2018, surgiu o “Selo ARTE”, quando a Lei nº 1.283 de dezembro de 1950 sofreu uma modificação significativa através da Lei nº 13.680, datada de 14 de junho de 2018, no âmbito da fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos artesanalmente (Brasil, 2018). A alteração introduziu o artigo 10-A, que entrou em vigor no seguinte contexto:

“Art. 10-A. É permitida a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal, com características e métodos tradicionais ou regionais próprios, empregadas boas práticas agropecuárias e de fabricação, desde que submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal.

§ 1º O produto artesanal será identificado, em todo o território nacional, por selo único com a indicação ARTE, conforme regulamento.

§ 2º O registro do estabelecimento e do produto de que trata este artigo, bem como a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização do produto, no que se refere aos aspectos higiênico-sanitários e de qualidade, serão executados em conformidade com as normas e prescrições estabelecidas nesta Lei e em seu regulamento.

§ 3º As exigências para o registro do estabelecimento e do produto de que trata este artigo deverão ser adequadas às dimensões e às finalidades do empreendimento, e os procedimentos de registro deverão ser simplificados.

§ 4º A inspeção e a fiscalização da elaboração dos produtos artesanais com o selo ARTE deverão ter natureza prioritariamente orientadora.

§ 5º Até a regulamentação do disposto neste artigo, fica autorizada a comercialização dos produtos a que se refere este artigo.”

Após essa alteração, o Decreto nº 9.918, datado de 29 de julho de 2019, foi promulgado, mas posteriormente revogado pelo atual Decreto em vigor, o nº 11.099 de 21 de junho de 2022. Este decreto regulamenta o artigo 10-A da Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950 e a Lei nº 13.860 de 18 de julho de 2019, abordando a produção e venda de produtos alimentícios de origem animal feitos de forma artesanal no Brasil (Brasil, 2022b). O decreto estabelece que o Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável por conceder selos a produtos artesanais que cumpram as normas técnicas e permite a venda interestadual de alimentos produzidos de forma artesanal, seguindo métodos tradicionais ou regionais, e boas práticas agropecuárias e de fabricação, desde que sejam fiscalizados pelos órgãos de saúde dos Estados e do Distrito Federal.

No contexto das normas técnicas mencionadas anteriormente, é importante destacar que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil é a entidade encarregada de regulamentar a irradiação de alimentos, visando assegurar a qualidade sanitária desses produtos. As diretrizes para esse procedimento foram estabelecidas por meio da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 21 de 26 de janeiro de 2001, a qual aprovou um regulamento estipulando limites para a contagem de microrganismos patogênicos em diversos tipos de alimentos (Brasil, 2001). Posteriormente essa resolução foi atualizada e revogada pela RDC nº 331 de 23 de dezembro de 2019 e complementada pela Instrução Normativa (IN) nº 60 de 23 de dezembro de 2019, trazendo critérios específicos para diversos grupos de alimentos (Brasil, 2019b).

No dia 1º de julho de 2022, foi promulgada a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 724, a qual regula os padrões microbiológicos dos alimentos e sua implementação (Brasil, 2022c). Esta RDC substituiu a anterior, RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Além disso, a Instrução Normativa (IN) nº 161 também foi estabelecida no mesmo dia, estipulando os padrões microbiológicos para alimentos e revogando a IN nº 60, de 23 de dezembro de 2019 (Brasil, 2022a). Isso definiu um novo conjunto de padrões microbiológicos a serem seguidos, com normas técnicas atualizadas, as quais incluem os produtos lácteos.

Diante do extenso histórico de regulamentações relacionadas aos padrões microbiológicos de queijos artesanais e industriais, observa-se que, ao longo do tempo, a evolução das regulamentações ocorre de forma natural, onde além de legislações voltadas à preservação das tradições locais, existe uma preocupação com a segurança alimentar desses produtos (Araújo et al., 2020).

2.4 Principais microrganismos em alimentos

A comunidade microbiana presente na indústria de laticínios desempenha um papel fundamental no processo de transformação do leite, matéria-prima, em uma variedade de produtos lácteos, influenciando significativamente em suas propriedades químicas e organolépticas (Pepi e Focardi, 2022). Nessa comunidade microbiana, estão presentes as bactérias ácido lácticas (BAL). Essas bactérias são importantes na microbiologia de queijos, não apenas contribuindo para fatores gustativos, mas também para a segurança microbiológica. Isso ocorre porque elas produzem bacteriocinas e compostos antifúngicos que, durante o processo de maturação, são excelentes colaboradoras na inibição de diversos patógenos (Bintsis, 2018).

Apesar do potencial microbiológico de redução da patogenicidade promovido pelas bactérias ácido lácticas durante a maturação, a introdução da Instrução Normativa nº 30 em 7 de agosto de 2013 trouxe uma flexibilização desse processo. Tornou-se possível a comercialização de produtos maturados com menos de 60 dias sob determinadas condições, desde que se comprove cientificamente que o produto se encontra em condições inócuas (Brasil, 2013). De acordo com Araújo et al. (2020), não existem critérios específicos a serem analisados por estudos científicos acerca da redução do tempo de maturação, tornando a temática “controversa” e “polêmica”, possibilitando a consideração de diversas perspectivas na avaliação dos dados. Este fato suscita questionamentos sobre a legislação estabelecida, uma vez que, com a diminuição do tempo de maturação, a ação das bactérias ácido lácticas na eliminação de patógenos também diminui.

Em relação aos microrganismos potencialmente patogênicos encontrados nos queijos, de acordo com as normas técnicas estabelecidas pela Instrução Normativa (IN) nº 161 de 1 de julho de 2022, os microrganismos e toxinas de interesse a serem analisados microbiologicamente nos leites pasteurizados estão todos contidos na família Enterobacteriaceae, sendo permitida a presença de até 100 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro. Na categoria referente a queijos, essa legislação determina que os produtos devem estar isentos de enterotoxinas estafilocócicas (ng/g) e *Salmonella* spp. (25g). Quanto às unidades formadoras de

colônia de *Escherichia coli* por grama, estabelecidas para esse produto, variam de acordo com a umidade de cada tipo de queijo. Para queijos ralados ou em pó e queijos com umidade acima de 46%, é permitida a presença de até 10^2 UFC/g, enquanto para queijos com umidade inferior a 46%, o limite é de 10 UFC/g. (Brasil, 2022a).

Entre os *Estafilococos* coagulase positiva, a principal espécie com potencial patogênico na saúde humana é o *Staphylococcus aureus*, esse microrganismo é importante devido sua rápida multiplicação e capacidade de produção de enterotoxinas termo resistentes que possam estar presentes em alimentos contaminados (Lehr et al., 2022). No que diz respeito à família Enterobacteriaceae, o gênero primordial de interesse é a *Salmonella* spp., devido ao seu elevado potencial patogênico, notadamente em casos de infecções alimentares causadas por microrganismos dessa mesma família (Santos et al., 2020).

A *Listeria monocytogenes*, que, assim como *S. aureus*, é um microrganismo halotolerante e formador de biofilme. Esse microrganismo apresenta crescimento em meios concentrados com cloreto de sódio (NaCl) na faixa de 10%, apresentando resistência quando a concentração atinge em torno de 20 a 30% (Santana, 2023).

De forma geral, o leite e o queijo são produtos com uma grande quantidade de nutrientes, tornando-se viáveis para o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos, sejam eles benéficos ou patogênicos (Oliveira et al., 2017). Os microrganismos patogênicos e suas toxinas normalmente não causam mudanças visíveis nas características do leite, tornando a contaminação não aparente. Assim, a detecção de patógenos no leite pode ser desafiadora, havendo negligências nesse processo, o que é crucial para a saúde pública (Vidal e Netto, 2018).

2.5 Queijos e Doenças Transmitidas por Alimentos

De acordo com o Ministério da Saúde, surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) ocorrem quando dois ou mais indivíduos apresentam sintomas parecidos após a ingestão de alimentos com a mesma procedência, com exceção de casos de cólera e botulismo, as quais basta apenas um caso para ser considerado

surto (Brasil, 2021). Geralmente as DTA's apresentam sintomas relacionados ao trato gastrointestinal, todavia, complicações fora desse sistema podem se manifestar no fígado, rins, sistema nervoso central e outros (Brasil, 2021).

Segundo o Boletim Epidemiológico emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde em 2020, os dados revelaram que, no período de 2016 a 2019, os casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) mantiveram-se estáveis em comparação com os anos anteriores, totalizando 2.504 surtos e afetando 37.247 pessoas (Brasil, 2020). Dentro desses 2.504 surtos, 541 tiveram seus patógenos identificados. Destes, cerca de 193 casos estavam relacionados à *Escherichia coli*, 81 casos associados a *Salmonella* spp. e 62 casos ligados a *Staphylococcus aureus* (Brasil, 2020). No mesmo boletim, constatou-se que, no período de 2016 a 2019, 81 dos casos de intoxicação ocorreram devido ao consumo de leite e derivados contaminados.

Sobre os relatos de caso, em 2019, na cidade de Cascavel, Paraná, uma família de cinco pessoas sofreu uma intoxicação alimentar devido a enterotoxinas estafilocócicas encontradas em um queijo colonial consumido durante o lanche da tarde, apresentando sintomas, como náuseas, vômitos e diarreias, minutos após o consumo (Langer, 2019). Outro caso de intoxicação alimentar por enterotoxinas estafilocócicas ocorreu na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, quando quatro pessoas de uma mesma família ingeriram queijo minas contaminado e apresentaram os mesmos sintomas do caso anterior (Sabioni et al., 1988).

Entre as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), as bactérias do gênero *Salmonella* spp. se destacam como causadoras frequentes, principalmente em queijos artesanais, devido à ausência de pasteurização e à intensa manipulação desse alimento. Listerioses também foram identificadas relacionadas ao consumo de leite cru e queijos frescos nos Estados Unidos em 1980, porém estudos identificaram que as técnicas de pasteurização foram suficientes para destruição do microrganismo (Vidal e Netto, 2018). Isso suscita questionamentos em relação à legislação brasileira, uma vez que os queijos artesanais não são submetidos ao processo de pasteurização para a eliminação desse patógeno.

Segundo (Ferraz, 2017), a taxa de mortalidade causada por listerioses em humanos acontece de 20 a 30% dos casos, dentre esses casos, o queijo contaminado por fatores ambientais é frequentemente identificado como a fonte de contaminação.

Assim, as doenças transmitidas por alimentos assumem elevada relevância no âmbito da saúde pública. Apesar da existência de regulamentações específicas e de vários meios de fiscalização para esses produtos, surtos ainda são frequentes. Nesse contexto, é necessário que os estabelecimentos implementem um controle de qualidade rigoroso, adotando as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e identifiquem possíveis falhas na cadeia produtiva, contribuindo ativamente para a redução das doenças transmitidas por alimentos (Françoso et al., 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar quantitativa e qualitativamente a presença de microrganismos indicadores e patogênicos em queijos artesanais e industriais, com o intuito de identificar possíveis falhas no processo produtivo e propor medidas para reduzir a incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar as populações de enterobactérias e estafilococos totais nas amostras por meio da técnica de contagem em superfície;
- Detectar a presença dos patógenos *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* utilizando métodos de microbiologia convencional;
- Confirmar a identidade dos microrganismos patogênicos detectados por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

- Avaliar a similaridade genética dos isolados patogênicos por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Comparar os parâmetros microbiológicos de queijos artesanais produzidos em propriedades com e sem a certificação do selo ARTE, a fim de identificar possíveis diferenças na qualidade sanitária dos produtos;
- Investigar o perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados, visando avaliar riscos potenciais à saúde pública.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras em 16 queijarias da Serra da Canastra, Minas Gerais, produtoras de queijo Minas Artesanal com média de 14 dias de maturação, no período de maio de 2022 à outubro de 2024. Oito propriedades não possuíam o selo ARTE (P1 a P8) e oito eram certificadas (P9 a P16). Nas propriedades sem selo ARTE, foram coletadas cinco amostras: leite cru, leite pasteurizado (exceto em P1, P7 e P8, onde não havia pasteurização), massa do queijo, queijo e *swab* da forma, totalizando 37 amostras. Nas propriedades certificadas, foram coletadas quatro amostras (leite cru, massa do queijo, queijo e *swab* da forma), totalizando 32 amostras. Dessa forma, das 69 amostras, sendo que 16 foram de leite cru, 5 de leite pasteurizado, 16 de massa do queijo, 16 de queijo e 16 de *swab* da forma.

As amostras foram coletadas com materiais esterilizados, armazenadas em tubos vedados e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (LABFIS/UEMG, Passos-MG) para quantificação microbiológica. Outras análises foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia e Resistência Bacteriana (BIOBAC/UNESP, FCAV, Jaboticabal-SP).

4.2 Quantificação microbiológica

Os grupos de Enterobacteriaceae e Estafilococos totais foram quantificados pela técnica de plaqueamento em superfície. De cada amostra, 25 g de alimentos sólidos, 25 mL de alimentos líquidos e 25 cm² de *swab* friccionado em superfície foram processados assepticamente e diluídos em água peptonada (1:10), sendo submetidos a diluições decimais seriadas até 10⁻³ (Campbell e Campbell, 1986). Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi inoculado nos meios de cultura específicos: Ágar MacConkey (MC – KASVI) para Enterobacteriaceae totais, aplicado apenas às amostras de leite pasteurizado (5 de 69), e Ágar Sal Manitol (SM – KASVI) para Estafilococos totais, utilizado em todas as 69 amostras (Brasil, 1993). Os inóculos foram homogeneizados com alça de Drigalski e incubados a 37 °C por 24h (Sanders, 2012). Após esse período, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Das 69 amostras, 0,1 mL de cada diluição 10⁻¹ foi transferido para tubos criogênicos contendo 0,5 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI – Himedia, Índia) e incubado a 37 °C por 24h. Após o crescimento, adicionou-se 0,5 mL de glicerol 30% e as culturas foram armazenadas em ultrafreezer -80 °C para análises posteriores.

4.3 Cultivo microbiológico para detecção de patógenos

Para recuperação metabólica, as amostras armazenadas a -80 °C foram incubadas em 5 mL de caldo BHI, contendo 100 µL do inóculo, a 37 °C por 24 h.

4.3.1 *Staphylococcus aureus*

Para o isolamento de *Staphylococcus aureus*, 0,1 mL do caldo BHI reativado foi semeado em placas de Ágar Sal Manitol, homogeneizado com alça de Drigalski e

incubado a 37 °C por 24 h. Colônias típicas com fermentação do manitol foram coletadas com *swab*, transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI, cultivadas a 37 °C por 24h e submetidas à extração de DNA (Tallent, et al. 2016).

4.3.2 *Salmonella* spp.

Para o isolamento de *Salmonella* spp., 0,1 mL de cada amostra do caldo BHI reativado foi inoculado em dois tubos contendo 10 mL de caldo Selenito-Cistina (KASVI) e 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (KASVI), ambos suplementados com 0,1 mL de novobiocina 4%. Os tubos foram incubados a 37 °C e 42 °C, respectivamente, por 24 h. Após o enriquecimento, uma alçada foi semeada em placas de Ágar MacConkey (MC) e Xylose Lysine Desoxycholate (XLD – KASVI) e incubada a 37 °C por 24 h (Andrews et al., 2024). Colônias típicas (incolores, com meio básico de cor palha em MC e negras em XLD) foram coletadas com *swab*, transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI, cultivadas a 37 °C por 24h e submetidas à extração de DNA.

4.3.3 *Listeria monocytogenes*

Para o isolamento de *Listeria monocytogenes*, 0,1 mL de cada amostra do caldo BHI reativado foi transferido para o caldo de enriquecimento *Listeria* (LEB – HIMEDIA) e incubado a 37 °C por 24 h. Em seguida, 0,1 mL do caldo primário foi transferido para frascos com 10 mL de caldo Fraser (SIGMA-ALDRICH) e incubado a 35 °C por 24 h (Hitchins et al., 2022). As culturas foram semeadas em Ágar PALCAM *Listeria* (SIGMA-ALDRICH), suplementado com o PALCAM *Listeria* Selective Supplement (SIGMA-ALDRICH) (Van Netten et al., 1989), e incubadas a 37 °C por 48 h. Colônias típicas de *Listeria* spp. (pequenas, negras e rodeadas por halo de hidrólise de

esculina) foram coletadas com *swab*, transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI, cultivadas a 37 °C por 24h e submetidas à extração de DNA.

4.4 Extração de DNA

A extração de DNA dos isolados bacterianos foi baseada no protocolo proposto por Bag et al., (2016). Para cada amostra sugestiva, 1,0 mL do cultivo bacteriano em caldo BHI foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 3 minutos, obtendo-se o pellet celular, com descarte do sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 450 μ L de tampão de extração [Tris-HCl 160 mM (pH 8,0), EDTA 50 mM (pH 8,0), NaCl 20 mM e SDS 0,5% (p/v)] e submetido à lise celular em banho seco Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 65 °C por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 180 μ L de acetato de potássio 5 M, e a solução foi mantida no gelo por 15 minutos. A purificação ocorreu com 400 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), seguido de centrifugação a $12.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, e 1.000 μ L de álcool etílico absoluto gelado foi adicionado para precipitação do DNA, mantido a -20 °C por 12 horas. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 18 minutos, o pellet de DNA foi lavado com 1.000 μ L de álcool etílico 70% (v/v), seco em estufa e ressuspendido em 30 μ L de tampão TE 10:1 [Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)]. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.5 Confirmação genética de patógenos

4.5.1 PCR de triagem

O DNA extraído foi utilizado na PCR de triagem para detecção de *S. aureus*, *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*, por meio da amplificação dos genes *cydB*, *invA* e *iap*, respectivamente (Bubert et al., 1999; de Almeida et al., 2018; Fratamico e

Strobaugh, 1998). Amostras positivas para pelo menos um dos genes analisados foram isoladas e submetidas à PCR confirmatória.

4.5.2 PCR Confirmatória e isolamento

As amostras que apresentaram positividade na PCR de triagem para *S. aureus* (*cydB*), *Salmonella* spp. (*invA*) e *Listeria monocytogenes* (*iap*) foram semeadas por esgotamento em ágar Sal Manitol, MacConkey e PALCAM, respectivamente, e incubadas a 37 °C por 24 a 48 h.

Para cada patógeno, dez colônias características foram selecionadas do meio seletivo e repicadas isoladamente em ágar BHI. Após incubação a 37 °C por 24 h, uma alçada de cada cultura foi transferida para tubos contendo 1 mL de caldo BHI (dez tubos por amostra positiva). Em seguida, os cultivos foram submetidos à extração de DNA e PCR para confirmação dos genes de interesse. As colônias positivas foram consideradas isolados.

Os isolados foram transferidos para tubos criogênicos contendo 0,5 mL de caldo BHI, incubados a 37 °C por 24 a 48 h e armazenados em glicerol 30% a -80 °C para análises futuras. O fluxograma do procedimento de detecção e isolamento de *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* está ilustrado na Figura 1.

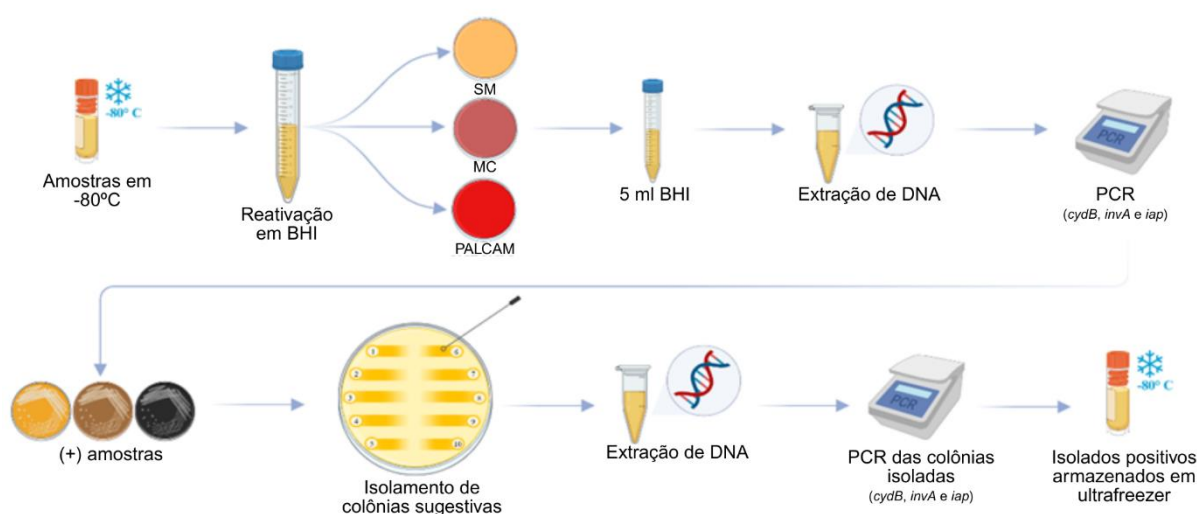


Figura. 1 Fluxograma do protocolo de isolamento e identificação bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

4.6 Testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.6.1 Triagem em meio seletivo com antibiótico

Para *S. aureus*, colônias dos isolados positivos foram ressuspensas em caldo BHI até atingirem turbidez equivalente a 0,5 McFarland. As suspensões foram semeadas em Ágar Sal Manitol contendo 6 µg/mL de oxacilina (SENSIDISC DME), utilizando alça de inoculação estéril, e incubadas a 35 °C, conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET, 2024), para avaliação do crescimento. Para Enterobacteriaceae, a triagem foi realizada nas 69 amostras, semeadas em Ágar MacConkey suplementado com 16 µg/mL de ceftazidima (SENSIDISC DME) e incubadas a 37 °C por 24 h. Colônias isoladas de amostras com crescimento nessa etapa foram armazenadas e enviadas para identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF no Instituto Biológico.

4.6.2 Teste de difusão em disco

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinada utilizando o método de difusão em disco descrito por Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Os isolados obtidos da PCR confirmatória foram repicados em placas com ágar BHI e incubados a 37 °C, as colônias isoladas foram suspensas em solução salina 0,9% e ajustadas em espectrofotômetro ao padrão 0,5 de McFarland. Após a padronização, as culturas foram semeadas em Ágar Mueller-Hinton (MH, Himedia – Índia) com auxílio de *swab* estéril. Após aproximadamente 3 minutos, foram aplicados os discos contendo os antimicrobianos recomendados pelo CLSI. Os diâmetros dos halos foram comparados com os guias CLSI (2025), CLSI VET (2024) e BrCAST (2025).

Os antimicrobianos testados para Enterobacteriaceae foram: amoxicilina + clavulanato (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefepime (30 µg), ceftazidima (10 µg),

imipenem (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefalexina (30 µg).

Para *S. aureus*, os antimicrobianos testados foram: eritromicina (15 µg), doxiciclina (30 µg), norfloxacin (10 µg), penicilina (10 µg), sulfametoxazol + trimetoprima (25 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), rifampicina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), ceftioxitina (30 µg) e azitromicina (15 µg).

4.7 Detecção genética de resistência e virulência em *Staphylococcus aureus*

Nos isolados de *S. aureus*, foram realizadas PCRs para detecção dos genes *mecA*, associado à resistência à meticilina (MRSA), e o gene *seA*, relacionado à produção da enterotoxina estafilocócica A, seguindo as mesmas condições descritas anteriormente (Kim et al., 2011; Mehrotra et al., 2000). Para os demais genes de interesse utilizados na identificação das espécies, as PCRs foram conduzidas conforme os protocolos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Primers das reações de PCR utilizadas.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho (pb)	Referência
<i>cydB</i>	CCCATTTGCTTGGTCTGTAGTA GTCCAGCCCATTCTGGATTA	432	De Almeida et al. (2018)
<i>invA</i>	CGGTGGTTTTAAGCGTACTATT CGAATATGCTCCACAAGGTTA	796	Fratamico e Strobaugh (1998)
<i>iap</i>	CAAACGTCT TTATACGCG	660	Bubert et al. (1999)
<i>mecA</i>	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163	Mehrotra et al. (2000)
<i>sea</i>	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	127	Kim et al. (2011)

4.8 Similaridade genética

A similaridade genética dos isolados de *S. aureus* foi avaliada por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) em gel de agarose Pulsifield Certified 1% (Bio-Rad, EUA), utilizando o sistema CHEF DR-III (Bio-Rad, EUA). O DNA cromossomal foi digerido com a enzima *XbaI* (Invitrogen, EUA) para os patógenos da família Enterobacteriaceae e com *IsmI* para *Staphylococcus*, conforme o protocolo do CDC (Ribot et al., 2006). As condições de eletroforese foram: tempo inicial de 2,2 s, tempo final de 54,2 s, com voltagem de 6 V cm⁻¹ e ângulo de 120°, sendo realizadas por 18h a 14°C. A linhagem *Salmonella* Braenderup (H9812), fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz, foi utilizada como controle e padrão para normalização dos resultados. A similaridade dos fragmentos gerados foi comparada usando o coeficiente de Dice, com 1% de tolerância e 1% de otimização, e o dendrograma foi construído pelo método UPGMA, utilizando o software BioNumerics 7.5 (Applied Maths). Foi aplicado um corte de 90% de similaridade no PFGE para considerar os isolados como geneticamente relacionados. A razão de diversidade (DR) foi calculada utilizando a fórmula na planilha WPS Office:

$$DR (\%) = \left(\frac{\text{número de perfis de bandas por PFGE}}{\text{número total de isolados}} \right) \times 100$$

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação microbiológica

Os resultados de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para Enterobacteriaceae e Estafilococos totais foram analisados de acordo com a Instrução Normativa nº 161 da ANVISA (leite pasteurizado, massa e queijo). Para o teste de swab, realizou-se um comparativo com parâmetros estabelecidos para análises industriais. Os valores detalhados estão apresentados na Tabela 2, na qual os

números em vermelho indicam amostras que ultrapassaram os limites estabelecidos: $\geq 1 \times 10^1$ UFC/mL para Enterobacteriaceae em leite pasteurizado; e $\geq 1 \times 10^3$ UFC/g para massa e queijo, e $\geq 1 \times 10^3$ UFC/cm² para swab, no caso de Estafilococos totais.

Tabela 2. Contagem detalhada de Enterobacteriaceae em leite pasteurizado e de Estafilococos totais em massa, queijo e swab da forma.

	ENTEROBACTERIACEAE		ESTAFILOCOCOS	
	Leite pasteurizado	Massa	Queijo	Swab
Sem selo ARTE				
P1	–	1,3 x 10 ³ UFC/g	1,52 x 10 ⁶ UFC/g	1,7 x 10 ³ UFC/cm ²
P2	1,05 x 10 ⁴ UFC/mL	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P3	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/mL	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	1 x 10 ² UFC/cm ²
P4	8,2 x 10 ³ UFC/mL	2,29 x 10 ⁴ UFC/g	5,8 x 10 ³ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P5	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/mL	2,0 x 10 ² UFC/g	7,0 x 10 ² UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P6	4,5 x 10 ⁵ UFC/mL	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	5,0 x 10 ² UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P7	–	3,1 x 10 ³ UFC/g	3,0 x 10 ³ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P8	–	2,0 x 10 ² UFC/g	3,0 x 10 ⁷ UFC/g	1,0 x 10 ² UFC/cm ²
Com selo ARTE				
P9	–	1,3 x 10 ³ UFC/g	2,24 x 10 ⁶ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P10	–	1,0 x 10 ² UFC/g	1,26 x 10 ⁵ UFC/g	8,0 x 10 ² UFC/cm ²
P11	–	6,5 x 10 ³ UFC/g	6,08 x 10 ⁶ UFC/g	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/cm ²
P12	–	5,0 x 10 ² UFC/g	8,8 x 10 ⁴ UFC/g	3,0 x 10 ² UFC/cm ²
P13	–	$\leq 1,0 \times 10$ UFC/g	1,75 x 10 ⁴ UFC/g	5,1 x 10 ² UFC/cm ²
P14	–	4,1 x 10 ⁴ UFC/g	2,53 x 10 ⁶ UFC/g	1,07 x 10 ⁵ UFC/cm ²
P15	–	1,5 x 10 ³ UFC/g	5,2 x 10 ⁵ UFC/g	2,1 x 10 ³ UFC/cm ²
P16	–	3,0 x 10 ² UFC/cm ²	5,0 x 10 ⁴ UFC/g	2,0 x 10 ² UFC/cm ²

Para Enterobacteriaceae, entre as cinco propriedades sem selo ARTE que realizavam a pasteurização do leite, três (P2, P4 e P6) apresentaram contagens bacterianas superiores ao limite regulamentar de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL para leite pasteurizado. Os valores observados foram de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL nas propriedades P2 e P4, e $2,8 \times 10^3$ UFC/mL na propriedade P6. Já nas propriedades com selo ARTE, a contagem bacteriana no leite pasteurizado não foi realizada, pois esses produtores utilizam leite cru na fabricação do queijo.

Para Estafilococos coagulase positiva, nas propriedades sem selo ARTE, P1 apresentou contagens elevadas na massa (> 1.000 UFC/g), queijo (> 1.000 UFC/g) e swab (> 1.000 UFC/cm²) da forma. P4 e P7 registraram valores acima dos limites na massa e no queijo, e P8 acima do permitido no queijo. Nas propriedades com selo ARTE, P9 e P11 tiveram excesso na massa e no queijo, enquanto P10, P12, P13 e

P16 registraram valores elevados apenas no queijo, P14 e P15 excederam os limites na massa, queijo e *swab* da forma. A Figura 2 apresenta a quantidade total de amostras que excederam o limite estabelecido em cada propriedade, para *Estafilococos coagulase positiva*.

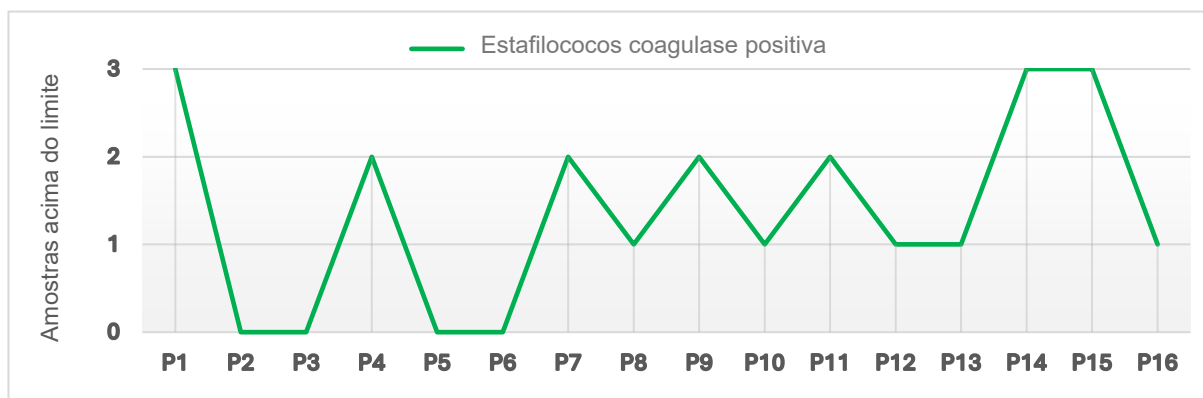


Figura 2. Propriedades e número total de amostras que excederam os limites da legislação para contagens de *Estafilococos coagulase positiva* de acordo com a Instrução Normativa Nº 161 da ANVISA.

Das amostras com selo Arte, 43,8% (14/32) excederam os limites estabelecidos pela legislação para *estafilococos coagulase positiva*, e nas amostras sem o selo, os percentuais foram de 21,6% (8/37).

5.2 Detecção de patógenos

Das 69 amostras analisadas, quatro (5,8%) foram positivas para *Staphylococcus aureus*, confirmadas pela presença do gene *cydB*, todos de propriedades sem selo ARTE. As amostras 11 (P3), 16 (P4) e 50 (P7), provenientes de leite cru, e 55 (P8), da massa de queijo, resultaram em 30 isolados de *S. aureus* após isolamento e confirmação por PCR, sendo 8 da amostra 11, 7 da amostra 16, 8 da amostra 55 e 7 da amostra 50. Não foi detectada a presença dos genes *invA* (*Salmonella* spp.) e *iap* (*Listeria monocytogenes*).

5.3 Testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos

5.3.1 Triagem em meio seletivo com antibiótico

As amostras 11, 16 e 50, positivas para *S. aureus*, apresentaram resistência fenotípica, com crescimento em ágar Sal Manitol contendo 6 mg/mL de oxacilina (4,35%). Quanto a Enterobacteriaceae, nove amostras (13,04%) demonstraram resistência fenotípica a ceftazidima: 21, 25, 26, 27, 31, 35, 38, 50 e 55, resultando em 11 isolados, que foram identificados por MALDI-TOF como as espécies apresentadas na Tabela 3.

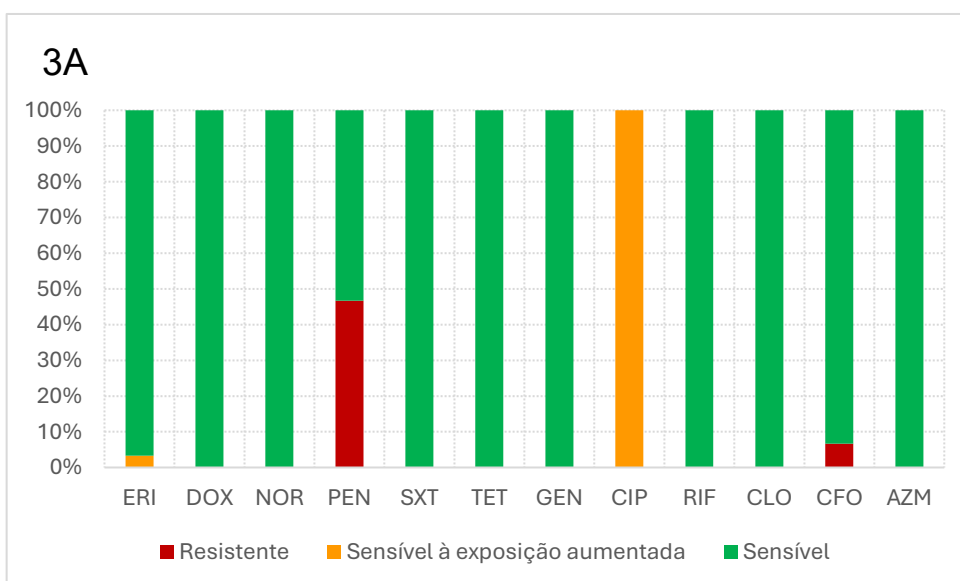
Tabela 3. Isolados de Enterobacteriaceae resistentes à ceftazidima, identificados por MALDI-TOF, e isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina, obtidos de diferentes propriedades e origens.

Microrganismo	Isolado	Propriedade	Selo ARTE	Origem
Enterobacteriaceae				
<i>Hafnia alvei</i>	21.1	P5	Não	Leite pasteurizado
<i>Hafnia alvei</i>	21.2	P5	Não	Leite pasteurizado
<i>Hafnia alvei</i>	25	P9	Sim	Leite cru
<i>Hafnia alvei</i>	26.1	P9	Sim	Massa do queijo
<i>Hafnia alvei</i>	26.2	P9	Sim	Massa do queijo
<i>Hafnia alvei</i>	27	P9	Sim	Queijo
<i>Hafnia alvei</i>	31	P10	Sim	Queijo
<i>Hafnia alvei</i>	35	P11	Sim	Queijo
<i>Hafnia alvei</i>	38	P12	Sim	Massa do queijo
<i>Enterobacter asburiae</i>	50	P7	Não	Leite cru
<i>Citrobacter freundii</i>	55	P8	Não	Massa do queijo
Staphylococcus sp.			Não	
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	P3	Não	Leite cru
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	P4	Não	Leite cru
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	P7	Não	Leite cru

5.3.2 Teste de difusão em disco

Entre os isolados de *Staphylococcus aureus*, observou-se resistência à penicilina (46,67% [14/30]) e à cefoxitina (6,67% [2/30]), enquanto o perfil de susceptibilidade foi amplo, com todos os isolados sensíveis a norfloxacin, doxiciclina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina, gentamicina, rifampicina, cloranfenicol e azitromicina (Figura 3A).

Quanto aos isolados de Enterobacteriaceae, foi observada resistência, entretanto, é resistência intrínseca das espécies isoladas. Destacando-se 100% para amoxicilina + clavulanato, ceftadizima, ampicilina, cefalotina, cefazolin, cefalexina, cefotaxima (80% [12/15]) e ceftriaxona (73,33% [11/15]). Por outro lado, apresentaram alta sensibilidade a cefepime (80% [12/15]), cefoxitina (60% [9/15]) e total sensibilidade ao imipenem (Figura 3B).



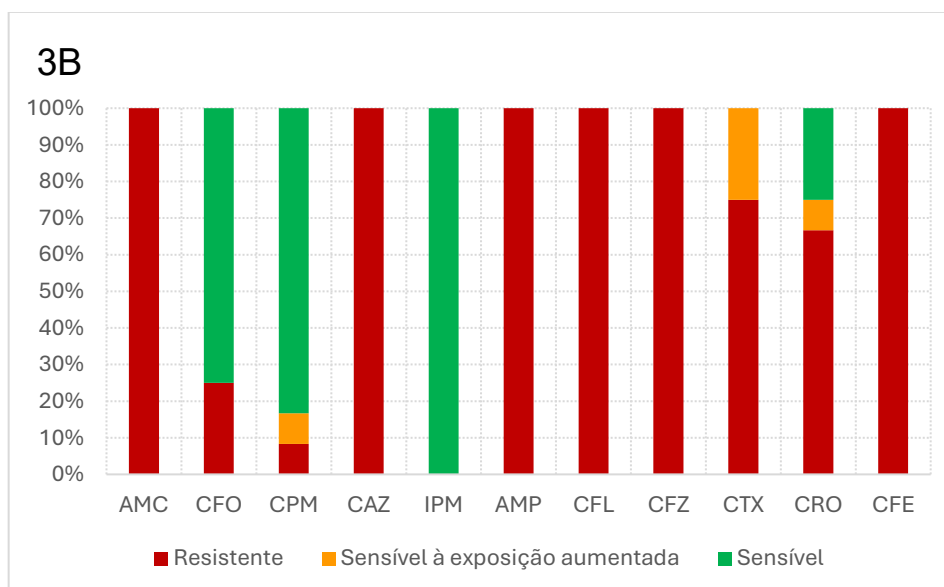


Figura 3. Distribuição percentual da suscetibilidade antimicrobiana, determinada pelo teste de difusão em disco, de *Staphylococcus aureus* (A), Enterobacteriaceae (B) isolados de amostras de leite cru, pasteurizado, massa e queijo, durante a produção do queijo Minas Artesanal na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.

AMC: Amoxicilina + Ácido Clavulânico, AMP: Ampicilina, AZM: Azitromicina, CAZ: Ceftazidima, CFL: Cefalotina, CFE: Cefalexina, CFZ: Cefazolina, CIP: Ciprofloxacino, CFO: Cefoxitina, CLO: Cloranfenicol, CPM: Cefepima, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, DOX: Doxiciclina, ERI: Eritromicina, GEN: Gentamicina, IPM: Imipeném, NOR: Norfloxacino, PEN: Penicilina, RIF: Rifampicina, SXT: Sulfametoxazol + Trimetoprima.; TET: Tetraciclina.

5.3.3 Detecção de genes de resistência e virulência

Não foi detectada a presença dos genes *sea* e *mecA* em *S. aureus*.

5.4 Similaridade genética

A análise do PFGE revelou 6 padrões distintos de perfil genético, considerando um ponto de corte de 90% de similaridade no dendrograma (Figura 4). A razão de diversidade (DR) foi de 20% (6/30). A similaridade genética variou de 55% a 95%, com agrupamentos bem definidos.

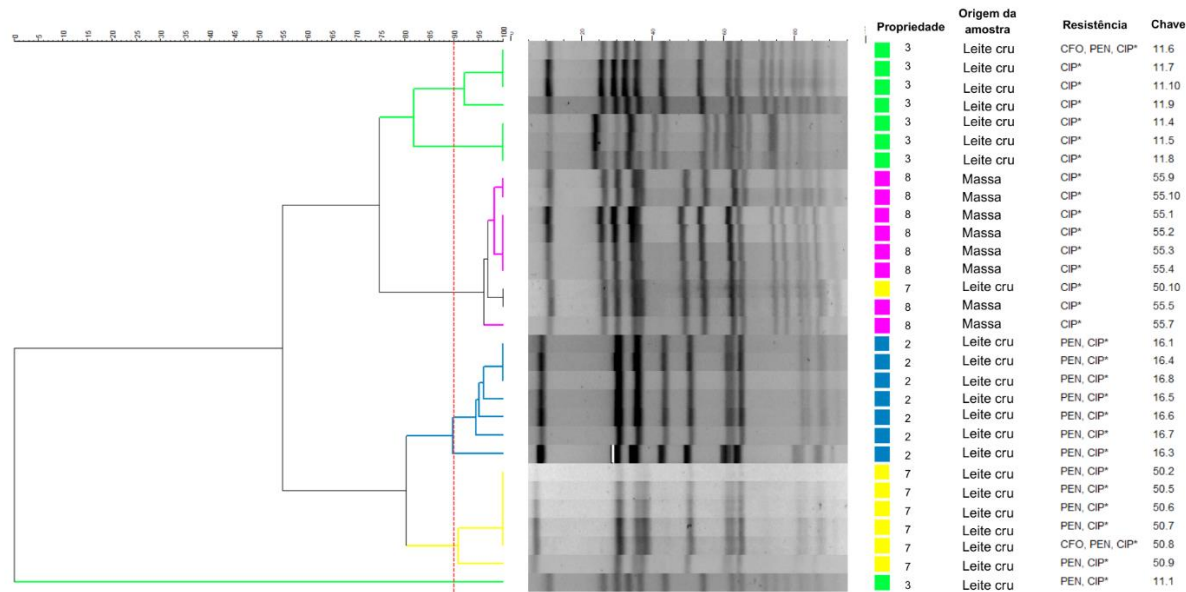


Figura 4. Dendrograma gerado pela comparação dos padrões de bandas no PFGE de isolados de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru e massa de queijo. A construção foi realizada utilizando o método de agrupamento UPGMA no software BioNumerics 7.5, com coeficiente de dados e otimização fixados em 1%. Foi aplicado o corte de similaridade PFGE de 90% (linha vermelha tracejada).

6. DISCUSSÃO

A Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022 (Brasil, 2022a) estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, determinando a ausência de toxinas ou metabólitos em níveis que comprometam a saúde do consumidor. Para leites pasteurizados, determina que, em um lote de cinco amostras, nenhuma pode apresentar mais de 10^1 UFC/mL de Enterobacteriaceae. No caso dos queijos, nenhuma das cinco amostras pode conter enterotoxinas estafilocócicas ou *Salmonella* spp. Além disso, até duas amostras podem apresentar Estafilococos coagulase positiva entre 10^2 e 10^3 UFC/g, quando a umidade do queijo for inferior a 46%. Os queijos artesanais devem atender aos padrões microbiológicos da Instrução Normativa Nº 161 ou seguir o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade específico para cada tipo artesanal específico.

No Brasil, a Anvisa, por meio da RDC nº 216/2004 estabelece boas práticas de fabricação e a obrigatoriedade do monitoramento ambiental, ainda sem definir valores numéricos específicos para UFC/cm² em utensílios de contato com alimentos (Brasil, 2004). Na União Europeia, o Reg. (CE) nº 852/2004 e a Decisão 2001/471/CE determinam o limite de ≤ 10 UFC/cm² para indústrias alimentícias sensíveis, como as de carnes (European Commission, 2001; 2004). Já em ambientes limpos, as normas da Farmacopeia dos Estados Unidos exigem contagens de ≤ 5 UFC por 25 cm² para superfícies em ambientes classificados como ISO 7 ou superiores, por exemplo, o equivalente a 0,2 UFC/cm² (United States Pharmacopeia (USP), 2021).

Embora não exista uma legislação específica para a aplicação da técnica de *swab* em queijos artesanais, este estudo realizou um comparativo com os parâmetros estabelecidos para análises industriais, utilizando esses padrões como base para avaliar a higienização e o controle microbiológico neste contexto. A maior manipulação direta e o menor controle automatizado dos processos artesanais impuseram a adoção do limite de ≤ 1000 UFC/cm² para *Estafilococos* totais.

A presença de contagens elevadas de *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado das propriedades P2, P4 e P6 pode ser atribuída tanto a falhas no processo térmico quanto à recontaminação pós-pasteurização. Este cenário pode estar relacionado à formação de biofilmes nos sistemas de pasteurização, cuja higienização inadequada, devido ao funcionamento em circuito fechado e à limpeza do tipo CIP (*clean-in-place*), pode favorecer a adesão bacteriana, comprometendo a eficácia da higienização e permitindo a contaminação do leite (Maifreni et al., 2015; Nasiri e Hanifian, 2022).

O queijo artesanal da microrregião da Serra da Canastra passa por um mínimo de 22 dias de maturação em prateleiras ventiladas, com proteção contra insetos, ficando exposto ao ambiente por um período prolongado (Minas Gerais, 2020b). Isso facilita a colonização microbiana, mesmo com todos os cuidados adotados.

O manejo intensivo na produção de queijos e o possível uso de leite cru de animais com mastite subclínica são fatores críticos para a contaminação por *Estafilococos* coagulase positiva, que indicam falhas nas práticas de higiene e manuseio (Andretta et al., 2019). *Staphylococcus aureus* é a espécie mais comum desse grupo, sendo frequentemente encontrada em altas contagens devido à sua associação com a mastite, especialmente quando o leite não recebe cuidados

adequados durante sua manipulação (Ribeiro et al., 2024). Esses achados são consistentes com os resultados deste estudo, no qual 73,33% (22/30) dos isolados de *S. aureus* foram recuperados de leite cru e 26,67% (8/30) da massa de queijo produzido com leite cru, todos provenientes de propriedades sem certificação Selo ARTE.

A detecção de *Staphylococcus aureus* em três amostras (11, 16 e 50), com resistência à oxacilina, onde dois isolados dessas amostras, (11.3 e 50.8), mostraram resistência à cefoxitina, não foi acompanhada pela presença do gene *mecA* ou de genes codificadores de enterotoxinas. Resultados semelhantes foram relatados por Aragão et al., (2019), com 7,4% de resistência à meticilina em *S. aureus* por testes fenotípicos, sem detecção do gene *mecA* ou de genes de enterotoxinas, e por Silva et al. (2021), com identificação de 10 cepas de *S. aureus* no queijo Minas Frescal, mas sem genes de resistência relacionados a enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE). Outros estudos também descreveram isolados resistentes à cefoxitina negativos para *mecA*, sugerindo a possível presença do gene *mecC* (Badawy et al., 2022; García-Álvarez et al., 2011) ou a ocorrência de variantes com baixa similaridade ao *mecA* clássico, as quais não são detectadas pelos métodos moleculares convencionais, evidenciando limitações nos testes atuais para identificar completamente a resistência à meticilina (Paterson et al., 2014; Stegger et al., 2012).

A ausência de *Salmonella* pode estar relacionada à sua baixa competitividade e à ausência de contaminação inicial. Além disso, sua sensibilidade a ambientes ácidos, com a presença de BAL e coliformes, dificulta seu desenvolvimento, especialmente quando a contaminação inicial ocorre em baixa concentração (Donegá et al., 2023). Esse efeito foi observado por Martins et al. (2015), que relataram a presença de *Salmonella* spp. em queijo maturado sob refrigeração nas duas primeiras semanas (8–15 dias). No entanto, após 22 dias, mesmo sob refrigeração, a bactéria não foi detectada, devido à sua ausência inicial na amostra ou ao acúmulo de ácido láctico e à redução do pH (<4,7).

Campagnollo et al. (2018) analisaram o efeito de bactérias ácido-láticas com atividade anti-listerial em leite contaminado com *Listeria monocytogenes*. Os resultados revelaram que, mesmo com um aumento expressivo na carga do patógeno (de 1 log para 5 log UFC/mL), a presença dessas bactérias reduziu o risco de infecção

em aproximadamente 1,5 vezes na população geral, mantendo efeito semelhante em grupos vulneráveis. Essas bactérias produzem bacteriocinas, compostos naturais estáveis a altas temperaturas, resistentes a variações de pH, sem cor ou odor, e com baixo risco de induzir resistência em patógenos, o que as torna ideais (Daba e Elkhateeb, 2020; Saragoça et al., 2024).

O fato de todos os isolados de *S. aureus* serem provenientes de propriedades sem selo ARTE sugere que a certificação pode estar associada a um maior controle sanitário e adoção de boas práticas, embora a presença de contagens elevadas em algumas propriedades certificadas demonstre que ainda há desafios na manutenção da qualidade microbiológica dos produtos. Esses achados reforçam a necessidade de medidas contínuas de fiscalização e treinamento dos produtores para assegurar a segurança microbiológica dos queijos artesanais e o cumprimento dos padrões estabelecidos pela legislação.

A alta prevalência de *Hafnia alvei* nas amostras, associada à resistência a antibióticos β -lactâmicos, é um achado consistente com o estudo de Merchán et al. (2022), que também identificaram esse microrganismo e associaram sua prevalência como uma das espécies mais predominantes em queijos de diferentes propriedades e regiões. Entretanto, *Hafnia alvei* é reconhecida por apresentar resistência intrínseca a esses antimicrobianos.

As espécies *H. alvei* e *C. freundii* são frequentemente encontradas no trato gastrointestinal, porém raramente implicam em infecções humanas (Pasquali et al., 2022). Os resultados do presente estudo são consistentes com achados prévios que demonstram a presença de *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. em queijos, com produção de ESBL e expressão de AmpC β -lactamase, reforçando a relevância dessas bactérias no contexto da segurança alimentar (Ritschard et al., 2022). Pasquali et al., (2022) ao avaliarem a patogenicidade de queijos artesanais italianos, encontraram predominância das bactérias *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei* e *Citrobacter freundii*, evidenciando a importância da padronização da qualidade microbiológica do leite de vaca e da adoção de boas práticas de limpeza e desinfecção durante o processo de produção, especialmente nas salas de maturação.

Na análise de diversidade genética, um achado relevante foi o agrupamento do isolado *S. aureus* do leite cru da P7 (chave 50.10) com os isolados da massa na P8.

A proximidade genética das cepas indica uma possível transmissão entre propriedades, possivelmente relacionada à proximidade geográfica e ao compartilhamento de práticas de manejo, incluindo movimentação do rebanho, uso equipamentos comuns e disseminação de cepas resistentes a antimicrobianos (Dendani e Arcangioli, 2023).

7. CONCLUSÕES

Apesar de um maior número de amostras com selo ARTE ter apresentado contagens acima dos limites microbiológicos legais, os isolados de *S. aureus* foram identificados exclusivamente em produtos de propriedades sem certificação, sugerindo que o selo ARTE pode estar relacionado a práticas mais eficazes de controle sanitário contra *S. aureus*. Além disso, nenhum isolado de *Salmonella* ou *Listeria* foi detectado nas amostras, reforçando a segurança microbiológica desses produtos. Observou-se um alto perfil de resistência nos isolados obtidos de Enterobacteriaceae, porém esta resistência é de caráter intrínseco. Por outro lado, a resistência fenotípica em *S. aureus* foi baixa, e nos casos em que foi detectada, não se identificou a presença do gene *mecA*. Assim, os resultados deste estudo destacam a importância do selo ARTE não apenas como um diferencial de mercado, mas também como um instrumento relevante para o monitoramento da qualidade microbiológica e para a promoção de boas práticas na produção de queijos artesanais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRETTA, M.; ALMEIDA, T. T.; FERREIRA, L. R.; CARVALHO, A. F.; YAMATOGLI, R. S.; NERO, L. A. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, 1 dez. 2019 v. 102, n. 12, p. 10790–10798.
- ANDREWS WH, WANG H, JACOBSON A, GE B, ZHANG G, HAMMACK T (2024) **Bacteriological Analytical Manual – Chapter 5: *Salmonella***. May 2024 Edition. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Washington, D.C. 34p.

ARAGÃO, B. B.; TRAJANO, S. C.; SILVA, J. G.; SILVA, B. P.; OLIVEIRA, R. P.; JUNIOR, J. W. P.; PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A. Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6923–6927, 1 ago. 2019.

ARAÚJO, J. P. A.; CAMARGO, A. C.; CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845–1860, set. 2020.

BADAWY, B.; ELAFIFY, M.; FARAG, A. M. M.; MOUSTAFA, S. M.; SAYED-AHMED, M. Z.; MOAWAD, A. A.; ALGAMMAL, A. M.; RAMADAN, H.; ELTHOLTH, M. Ecological Distribution of Virulent Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in Livestock, Environment, and Dairy Products. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1651, 18 nov. 2022.

BAG, S.; SAHA, B.; MEHTA, O.; ANBUMANI, D.; KUMAR, N.; DAYAL, M.; PANT, A.; KUMAR, P.; SAXENA, S.; ALLIN, K. H.; HANSEN, T.; ARUMUGAM, M.; VESTERGAARD, H.; PEDERSEN, O.; PEREIRA, V.; ABRAHAM, P.; TRIPATHI, R.; WADHWA, N.; BHATNAGAR, S.; PRAKASH, V. G.; RADHA, V.; ANJANA, R. M.; MOHAN, V.; TAKEDA, K.; KURAKAWA, T.; NAIR, G. B.; DAS, B. An Improved Method for High Quality Metagenomics DNA Extraction from Human and Environmental Samples. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 26775, 31 maio 2016.

BAVA, R.; CASTAGNA, F.; LUPIA, C.; POERIO, G.; LIGUORI, G.; LOMBARDI, R.; NATURALE, M. D.; MERCURI, C.; BULOTTA, R. M.; BRITTI, D.; PALMA, E. Antimicrobial Resistance in Livestock: A Serious Threat to Public Health. **Antibiotics**, v. 13, n. 6, p. 551, 13 jun. 2024.

BERNARDES, N. dos R. **Análise da competitividade de laticínios em Goiás**. 2022. Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, 2022.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access**, v. 6, n. 2, p. 89–94, 15 mar. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022**. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 jun. 2022a. p. 1–5.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952**. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 29 mar. 1952.

BRASIL. **Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006**. Regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, n. 8, p. 1–50, 30 mar. 2006.

BRASIL. **Decreto nº 8.471, de 22 de junho de 2015.** Reconhece como agroindústrias artesanais os estabelecimentos que produzam bebidas e produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 jun. 2015.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017.** Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos.** *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 6 jul. 2022a.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013.** Estabelece critérios para a maturação de queijos artesanais produzidos com leite cru. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 7 ago. 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019.** Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 23 dez. 2019. v. 11, n. 1, p. 1–14.

BRASIL. **Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950.** Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 dez. 1950. p. 1–4.

BRASIL. **Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018.** Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 jun. 2018. p. 2.

BRASIL. **Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019.** Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 19 jul. 2019.

BRASIL. **Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989.** Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 nov. 1989. v. 6, p. 23–24.

BRASIL. **Lei nº 9.712, de 20 de novembro de 1998.** Altera a Lei nº 8.171, de 17 de janeiro de 1991, acrescentando-lhe dispositivos referentes à defesa agropecuária. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 20 nov. 1998. p. 3–5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Portaria no 100, de 10 de agosto de 1993.** *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, n.156, p.11950. Seção I, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos.** *Boletim Epidemiológico*, Brasília, DF, n. 32, v. 51, p. 1–35, 2020.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001.** Regulamento técnico para irradiação de alimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 26 jan. 2001. p. 11.

BRASIL. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004.** Regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 15 set. 2004.

BRASIL. **Resolução RDC nº 724, de 1º de julho de 2022.** Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1 jul. 2022c.

BRASIL. **Vigilância epidemiológica das doenças de transmissão hídrica e alimentar: manual de treinamento.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, 2021. 196 p.

BUBERT, A.; HEIN, I.; RAUCH, M.; LEHNER, A.; YOON, B.; GOEBEL, W.; WAGNER, M. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4688–4692, out. 1999.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GONZALES-BARRON, U.; PILÃO CADAVEZ, V. A.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNER, D. W. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**, v. 92, p. 370–379, 1 out. 2018.

Campbell, J. M., & Campbell, J. B. (1986). Diluições. In *Matemática de laboratório: aplicações médicas e biológicas* (3ª ed., pp. 77–118). São Paulo, SP: Roca

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery. **CDC**. Disponível em: <https://archive.cdc.gov/www_cdc_gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html>. Acesso em: 18 mar. 2025.

CHAVES, A. C. S. D.; STEHLING, C. A. do V.; SOUZA, G.; SANTOS, L. C. R. dos; GOMES, P. B.; CASTRO, R. A. B. de; MONTEIRO, RODRIGO PARANHOS; FERREIRA, V. R. **Queijos Artesanais Brasileiros**. EMBRAPA, p. 16, 2021.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2024) **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**. 6th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2025) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 35th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute,

Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (BRCAST) (2025) **Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos – Versão 2025**. São Paulo: BRCAST.

DA SILVA, A. C.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N. C. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 347–356, 30 mar. 2020.

DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101750, 1 set. 2020.

DE ALMEIDA, C. C.; PIZAURO, L. J. L.; SOLTES, G. A.; SLAVIC, D.; DE ÁVILA, F. A.; PIZAURO, J. M.; MACINNES, J. I. Some coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from buffalo can be misidentified as *Staphylococcus aureus* by phenotypic and Sa442 PCR methods. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 346, 30 dez. 2018.

DENDANI CHADI, Z.; ARCANGIOLI, M.-A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of Bovine Associated *Staphylococcus aureus*: A Review. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 966, 24 jul. 2023.

DONEGÁ, F. T.; FERREIRA, L. M.; MELLO, L. L. de; DELOMO, G. M. Analysis of total, thermotolerant and *Salmonella* spp. in artisanal cheeses with the ARTE Seal sold in Ribeirão Preto – SP. **Journal of Agricultural Sciences Research** (2764-0973), v. 3, n. 2, p. 2–12, 13 fev. 2023.

EFSA. Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. **EFSA Journal**, v. 7, n. 3, 1 mar. 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Decision 2001/471/EC Official **Journal of the European Union**. European Commission, 8 maio 2001. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001D0471>>. Acesso em: 22 jun. 2025.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) No 852/2004 on the Hygiene of Foodstuffs Official **Journal of the European Union**. European Commission, 29 abr. 2004. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32004R0852>>. Acesso em: 22 jun. 2025.

FERRAZ, A. R. S. **Estudo das vias de contaminação de *Listeria monocytogenes* numa queijaria PFGE, serotipagem, WGS e resistência a desinfetantes**. Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar. 2017. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Lisboa, Portugal, 2017.

FRANÇOSO, V. F. R.; DA SILVA, B. N. P.; CIRICO, G. de M.; FONTES, J. L. F. Segurança de alimentos: importância de informação e uso de boas práticas de

fabricação no processo produtivo. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 1, p. 189–209, 2 jan. 2023.

FRATAMICO, P. M.; STROBAUGH, T. P. Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 92–98, 1 set. 1998.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, p. 33-36, 1980.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; MASKELL, D. J.; HOLMES VETMB, M. A.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; J BROWN, D. F.; CURRAN, M. D.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HOLMES, M. A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; G HOLDEN, M. T.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; J BROWN, D. F.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; KIRSTY GIRVAN, E.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; R HILL, R. L.; RHOD LARSEN, A.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Articles Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 595–603, 2011.

GELALCHA, B. D.; DEGO, O. K. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Enterobacteriaceae in the USA Dairy Cattle Farms and Implications for Public Health. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1313, 27 set. 2022.

Hitchins AD, Jinneman K, Burall LS, MacDonald P, Chen Y, Laidler MR (2022) **Bacteriological Analytical Manual – Chapter 10: *Listeria monocytogenes***. April 2022 Edition. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Washington, D.C. 23p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2017: resultados definitivos**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. v. 1, p. 81–109.

JACKSON, K. A.; GOULD, L. H.; HUNTER, J. C.; KUCEROVA, Z.; JACKSON, B. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–20141. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1116–1118, 1 jun. 2018.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 997–1004, 20 mar. 2015a.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUGUENIN, M.-C.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 2944–2948, 1 maio 2015b.

KIM, N. H.; YUN, A. R.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1456–1464, 2011.

LANGER, R. O. de S. Surto de intoxicação alimentar por toxina estafilocócica no município de Cascavel, Paraná - 2019. **Anais do 8º Simpósio BRASILEIRO DE Vigilância Sanitária**, p. 2, 2019. Disponível em: <<https://proceedings.science/simbravisa-2019/trabalhos/surto-de-intoxicacao-alimentar-por-toxina-stafilococica-no-municipio-de-cascave?lang=pt-br>>

LEHR, D. E. S.; KLEINA, D. da R.; PEREIRA, M. G. INCIDÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA EM CARNE MOÍDA DE BOVINO COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE CHAPECÓ (SC). *Em: Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos* - Volume 6. [s.l.] Editora Científica Digital, 2022. p. 264–274.

MAIFRENI, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; BUIATTI, S.; PICON, S.; MARINO, M. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. **Food Control**, v. 50, p. 809–814, 1 abr. 2015.

MARTINS, J. M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219–230, maio 2015.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, mar. 2000.

MENESES, J. N. C. **Queijo Artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil**. Dossiê interpretativo Vol. I, p. 156, maio 2006.

MERCHÁN, A. V.; RUIZ-MOYANO, S.; HERNÁNDEZ, M. V.; MARTÍN, A.; LORENZO, M. J.; BENITO, M. J. Characterization of autochthonal *Hafnia* spp. strains isolated from Spanish soft raw ewe's milk PDO cheeses to be used as adjunct culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 373, 16 jul. 2022.

MINAS GERAIS. **Decreto nº 48.024, de 19/08/2020**. Regulamenta a Lei no 23.157, de 18 de dezembro de 2018, que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Minas Gerais Diário do Executivo Brasil. Pág. 1 Col. 1, 19 ago. 2020a.

MINAS GERAIS. **Lei nº 23.157 de 18/12/2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Minas Gerais Diário do Executivo Brasil. Caderno 1, ano 126, n. 234, 18 dez. 2018.

MINAS GERAIS. **Portaria IMA Nº 1.969, de 26 de março de 2020**. Dispõe sobre a produção de Queijo Minas Artesanal em queijarias e entrepostos localizados dentro de microrregiões definidas e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de Queijo Minas Artesanal – QMA. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)Brasil. 26 mar. 2020b.

MONTEIRO, R. P.; MATTA, VIRGINIA MARTINS DA CHAVES, A. C. S. D.; MACHADO, R. L. P.; SÁ, D. de G. C. F. de; TAKEITI, C. Y.; MORAES, M. C. de; PORTES, P. C. de A. **Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar**. Brasília: EMBRAPA, 2018. 102 p.

NASIRI, M.; HANIFIAN, S. Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in pasteurized milk: Prevalence, genotyping, and characterization of virulence traits. **LWT**, v. 153, p. 112452, 1 jan. 2022.

NETO, J. A. **PRÁTICAS DE GESTÃO DA QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE QUEIJO COALHO: O CASO DE PERNAMBUCO**. Recife: [s. n.], 2016. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/4433/2/JomarAustregesiloNeto.pdf>.

OLIVEIRA, A. M.; KURIHARA, R. Y.; SILVA, F. F. da; SILVA, F. D. G.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V. Condições Higiênico-Sanitárias Da Produção De Queijos Tipo Mussarela E Minas Frescal Comercializados No Norte Do Paraná. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 40, 2017.

PASQUALI, F.; VALERO, A.; POSSAS, A.; LUCCHI, A.; CRIPPA, C.; GAMBI, L.; MANFREDI, G.; DE CESARE, A. Occurrence of foodborne pathogens in Italian soft artisanal cheeses displaying different intra- and inter-batch variability of physicochemical and microbiological parameters. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 25 ago. 2022.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42–7, jan. 2014.

PEPI, M.; FOCARDI, S. The Microbiology of Cheese and Dairy Products is a Critical Step in Ensuring Health, Quality and Typicity. **Corpus Journal of Dairy and Veterinary Science (CJDVS)**, v. 3, n. 3, p. 1–9, 25 jul. 2022.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; RODRIGUES, E. M.; DIAS, B. P.; DA SILVA, E. P. R.; ALEXANDRINO, B.; LOBO, C. M. O.; TAMANINI, R.; ALFIERI, A. A. Toxigenic characterization, spoilage potential, and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* species isolated from Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 3, p. 1386–1396, 1 mar. 2024.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**. New York, v. 3, n. 1, p. 59-67, Apr. 2006.

RITSCHARD, J. S.; VAN LOON, H.; AMATO, L.; MEILE, L.; SCHUPPLER, M. High Prevalence of Enterobacteriales in the Smear of Surface-Ripened Cheese with Contribution to Organoleptic Properties. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 361, 26 jan. 2022.

ROBINSON, E.; TRAVANUT, M.; FABRE, L.; LARRÉCHÉ, S.; RAMELLI, L.; PASCAL, L.; GUINARD, A.; VINCENT, N.; CALBA, C.; MEURICE, L.; LE THIEN, M. A.; FOURGERE, E.; JONES, G.; FOURNET, N.; SMITH-PALMER, A.; BROWN, D.; LE HELLO, S.; PARDOS DE LA GANDARA, M.; WEILL, F. X.; JOURDAN-DA SILVA, N. Outbreak of *Salmonella* Newport associated with internationally distributed raw goats' milk cheese, France, 2018. **Epidemiology and infection**, v. 148, p. e180, 4 maio 2020.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. de L. R. de. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 5, p. 458–461, 1988.

Sanders ER (2012) Aseptic laboratory techniques: plating methods. **Journal of Visualized Experiments**, (63): e3064. <https://doi.org/10.3791/3064>

SANTANA, M. F. da S. E. de. **Biofilmes de patógenos de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e controle**. 2023. Universidade Federal de São Carlos, Buri - São Paulo, 2023.

SANTOS, K. P. O. dos; FARIA, A. C. dos S. R.; SILVA, D. P. A.; LISBOA, P. F.; COSTA, A. de P.; KNACKFUSS, F. B. *Salmonella* spp. como agente causal em Doenças Transmitidas por Alimentos e sua importância na saúde pública: Revisão. **Pubvet**, v. 14, n. 10, p. 1–9, out. 2020.

SARAGOÇA, A.; CANHA, H.; VARANDA, C. M. R.; MATERATSKI, P.; CORDEIRO, A. I.; GAMA, J. Lactic acid bacteria: A sustainable solution against phytopathogenic agents. **Environmental Microbiology Reports**, v. 16, n. 6, 2 dez. 2024.

SILVA, M. P.; CARVALHO, A. F.; ANDRETTA, M.; NERO, L. A. Presence and growth prediction of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal cheese, a soft fresh cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 12, p. 12312–12320, 1 dez. 2021.

STEGGER, M.; ANDERSEN, P. S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M. A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SKOV, R.; LARSEN, A. R. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 4, p. 395–400, abr. 2012.

TADJINE, D.; BOUDALIA, S.; BOUSBIA, A.; KHELIFA, R.; MEBIROUK BOUDECHICHE, L.; TADJINE, A.; CHEMMAM, M. (2020) Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 580–587, set. 2020.

TALLENT S, HAIT J, BENNETT RW, LANCETTE GA (2016) **Bacteriological Analytical Manual – Chapter 12: *Staphylococcus aureus***. March 2016 Edition. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Washington, D.C. 7p.

TITOUCHE, Y.; AKKOU, M.; HOUALI, K.; AUVRAY, F.; HENNEKINNE, J. Role of milk and milk products in the spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the dairy production chain. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 9, p. 3699–3723, 27 set. 2022.

UNG, A.; BAIDJOE, A. Y.; VAN CAUTEREN, D.; FAWAL, N.; FABRE, L.; GUERRISI, C.; DANIS, K.; MORAND, A.; DONGUY, M.-P.; LUCAS, E.; ROSSIGNOL, L.; LEFÈVRE, S.; VIGNAUD, M.-L.; CADEL-SIX, S.; LAILLER, R.; JOURDAN-DA SILVA, N.; LE HELLO, S. Disentangling a complex nationwide Salmonella Dublin outbreak associated with raw-milk cheese consumption, France, 2015 to 2016. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 3, 17 jan. 2019.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments (USP <1116>)**. Em: UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. United States Pharmacopeia 43 – National Formulary 38 (USP 43–NF 38). Rockville, MD, USA: United States Pharmacopeia Convention, 2021.

Van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G. D., & Mossel, D. A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. **International journal of food microbiology**, 8(4), 299–316. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90001-9)

VIDAL, A. Ma. C.; NETTO, A. S. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassununga - SP: Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018. 229 p.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>>.