

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS FRESCOS NÃO
INSPECIONADOS PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS
INFORMALMENTE EM BOTUCATU E PARDINHO, ESTADO DE
SÃO PAULO**

ANA CAROLINA DE SÁ

BOTUCATU - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS FRESCOS NÃO
INSPECIONADOS PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS
INFORMALMENTE EM BOTUCATU E PARDINHO, ESTADO DE
SÃO PAULO**

ANA CAROLINA DE SÁ

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia,
Campus de Botucatu, Unesp,
para obtenção do título de
mestre no Programa de Pós-
Graduação em Medicina
Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

BOTUCATU-SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Sá, Ana Carolina de.

Avaliação microbiológica de queijos frescos não inspecionados produzidos e comercializados informalmente em Botucatu e Pardinho, estado de São Paulo / Ana Carolina de Sá. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Coorientador: Juliano Gonçalves Pereira

Capes: 50505009

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Queijo - Comercialização. 3. Inspeção. 4. Setor informal (Economia).

Palavras-chave: Comércio informal; Doenças de origem alimentar; Microbiologia de alimentos; Queijo.

Ana Carolina de Sá

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS FRESCOS NÃO
INSPECIONADOS PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS INFORMALMENTE
EM BOTUCATU E PARDINHO, ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Comissão examinadora

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu

Dedico a todas as mulheres que de alguma forma duvidaram de sua própria capacidade e potencial.

“A adversidade desperta em
nós capacidades que, em
circunstâncias favoráveis,
teriam ficado adormecidas”

Horácio

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e aos meus guias espirituais pela inspiração e força que fizeram toda a diferença durante a minha trajetória acadêmica.

Aos meus filhos, Júlia, Sophia e Caíque, pela colaboração e compreensão nos momentos que foram necessários e por todo o amor que sempre me deram, superamos esse desafio juntos, amo vocês!

À minha mãe, Silvana, por todo o esforço e incentivo desde sempre confiando no meu potencial para que hoje eu pudesse estar onde estou, me vejo em você por toda sua garra e determinação. Obrigada por ter me dado a vida e por ter abdicado de inúmeras coisas em prol do meu crescimento, hoje como mãe eu entendo, reconheço e agradeço todo o seu esforço.

Ao meu pai, Paulo, por estar mais próximo e presente na minha vida além de me apoiar e me incentivar a ir atrás dos meus objetivos, me vejo em você por ser resiliente e não desistir dos meus sonhos. Obrigada por ter me dado a vida e por me ensinar que o amor não é uma questão de merecimento.

A minha vó Estela pelo amor e dedicação que sempre teve por mim.

A minha irmã Hannah que mesmo com a distância sempre se fez presente, esteve ao meu lado torcendo para que tudo desse certo. Obrigada pelo carinho e pelo acolhimento.

Aos meus irmãos Danny e Gabriel pela admiração e incentivo.

Aos meus avós maternos (Lourdes e Nicanor) e bisavós paternos (Cândido e Stela), ambos *in memoriam*, obrigada pelo amor que tinham por mim, sei que de onde estiverem devem estar orgulhosos, essa conquista é de todos nós.

A minha tia Cida (*in memoriam*) por ter ajudado a me criar e por todo o carinho que me acolhia.

A minha tia Nê por todos os conselhos e pelo carinho que sempre me acolheu.

A minha amiga e psicóloga Mari Cordeiro que foi uma peça fundamental para o meu retorno à minha profissão e à vida acadêmica. Obrigada por fazer eu acreditar em mim mesma e assumir as rédeas da minha vida. Te admiro muito e sou muito grata por toda a sua ajuda.

Ao meu orientador, Paes, pelo aceite de orientação, por ser um exemplo de sabedoria e por auxiliar no meu crescimento profissional de forma ética e correta. É uma

honra ser orientada pelo professor que eu admiro desde a graduação. Obrigada pela oportunidade de trabalhar contigo.

Ao meu co-orientador, Juliano, pelo exemplo de pessoa e profissional ético, demonstrando empatia nos momentos de maior dificuldade, o qual não mediu esforços para me auxiliar durante a execução do meu trabalho, agradeço a todo auxílio, trocas de ideias, paciência e conselhos.

Aos meus amigos Leonardo e Emanoelli pela amizade, companheirismo, paciência e todos os ensinamentos, admiro muito vocês! Obrigada pelos conselhos e risadas que me ajudaram a encarar esse momento desafiador com alegria e leveza.

As minhas amigas Camila e Lara, pelo carinho e pelas conversas descontraídas que faziam nosso dia a dia mais divertido e prazeroso.

A minha amiga Layara pela amizade, pela ajuda e companhia sempre presente em todos os momentos do projeto e fora da faculdade também. Obrigada por toda a força e pelo carinho comigo e com as crianças.

Aos professores Pantoja e Otávio pela amizade e disposição em sempre me ajudar.

A toda a equipe do SOAP, doutorandos, mestrandos, residentes, estagiários e funcionários, agradeço por nosso convívio diário repleto de aprendizagem, amizade e companheirismo. Que felicidade fazer parte desta equipe!

Aos professores Mateus Mioni e Fábio Possebon (“Cid”) pela disponibilidade em me ajudar com as análises moleculares e por todos os ensinamentos.

A Ana Paula Flamínio pela ajuda com as análises moleculares de *Mycobacterium* e por todos os ensinamentos.

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

A Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pelo auxílio a execução do projeto.

Agradeço a todos os amigos que de alguma forma colaboraram para a conclusão desta etapa.

Muito obrigada!

SÁ, A. C. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS INFORMALMENTE EM BOTUCATU E PARDINHO, ESTADO DE SÃO PAULO. 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade higiênico-sanitária de 51 queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária e comercializados informalmente por produtores rurais, estabelecimentos comerciais e venda ambulante (feiras livres e por anúncios em *websites*) na região de Botucatu/SP. Foram realizadas análises microbiológicas para pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e contagem de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Pseudomonas* spp., assim como análises moleculares para detecção de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*. *L. monocytogenes* e *Coxiella burnetii* estavam presentes em 1,96% e 7,84% das amostras, respectivamente. Foram observadas contagens acima do limite regulamentar brasileiro para *Staphylococcus* coagulase positiva em 15 amostras (29,41%) e *Escherichia coli* em 11 amostras (21,56%). A presença de *Bacillus cereus* foi confirmada em 2 amostras (3,92%) com contagens de 3,96 log UFC/g e 3,34 log UFC/g. O alto número de amostras fora de conformidade com a legislação é um dado preocupante, que pode demonstrar o risco que o comércio desses queijos traz para a saúde pública. Ações mais assertivas frente a fiscalização do comércio de queijos frescos informais se fazem necessárias visto que tal produto pode ser um fator agravante para a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar.

Palavras-chaves: doenças de origem alimentar; produto artesanal; queijo; segurança dos alimentos.

SÁ, A. C. MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF NOT INSPECTED FRESH CHEESES PRODUCED AND COMMERCIALIZED INFORMALLY IN BOTUCATU AND PARDINHO, STATE OF SÃO PAULO. 2022. 64 f. Thesis (MSc. in Veterinarian Medicine) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, 2022.

Abstract

The present study aimed to evaluate the hygienic-sanitary quality of 51 fresh cheeses produced without sanitary inspection and commercialized informally by farmers, commercial establishments and through street sale (fairs and the internet) in the region of Botucatu/SP. Microbiological analyses were performed to detect *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. and counting of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, coagulase positive *Staphylococcus* and *Pseudomonas* spp. and also molecular analysis for detection of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Coxiella burnetii*. *Salmonella* spp., *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* were not detected. *L. monocytogenes* and *Coxiella burnetii*, were detected in 1.96% and 7.84% of samples, respectively. Counts above the Brazilian sanitary legislation for coagulase positive *Staphylococcus* were observed in 15 samples (29.41%) and *Escherichia coli* in 11 samples (21.56%). The presence of *Bacillus cereus* was confirmed in 2 samples (3.92%) with counts of 3.96 log CFU/g and 3.34 log CFU/g. The large number of samples out of compliance with the legislation is an alarming fact demonstrating the risk that the trade of these artisanal cheeses brings to public health. More assertive actions against the inspection of the trade of informal fresh cheeses is necessary since such product can be an aggravating factor for the occurrence of outbreaks of diseases transmitted by food.

Keywords: artisanal; cheese; foodborne disease; food safety.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagens média de microrganismos indicadores de qualidade-higiênico sanitária e presença de patógenos em amostras de queijos frescos não inspecionados (n=51) comercializados na região de Botucatu, SP.....	43
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número de amostras conforme e não conforme de acordo padrões legais da IN nº 161 (BRASIL, 2022) e Champagne et al. (1994).....	44
--	----

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
CDC	<i>Center of Disease Control</i>
CMT	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DOA	Doenças de Origem Alimentar
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAggEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente adesiva
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FI	Fonte de Infecção
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
LCV	<i>Large cell variant</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NACL	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCEBT	Plano Nacional Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SCV	<i>Small cell variant</i>
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
TTP	Púrpura Trombótica Trombocitopênica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	17
OBJETIVOS.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

CAPÍTULO II

TRABALHO CIENTÍFICO.....	41
ABSTRACT.....	41
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO.....	58
REFERENCIAS.....	59

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
---------------------------	----

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O queijo fresco é um produto apreciado em todo o território brasileiro constituindo, uma das fontes de renda da agricultura familiar e de pequenos produtores rurais. Entretanto, a infraestrutura deficiente de muitas propriedades associada, as inúmeras falhas na produção e conservação do queijo somados a baixa qualidade sanitária da matéria prima colaboram para proporcionar condições favoráveis para a contaminação e, conseqüentemente, o crescimento microbiano colocando em risco a segurança microbiológica do alimento e a saúde dos indivíduos que o consomem (AMORIM et al., 2014).

A inspeção sanitária tem por objetivo assegurar que o produto comercializado atenda aos parâmetros de segurança de alimentos, garantindo a qualidade higiênico-sanitária e, conseqüentemente, a inocuidade do alimento; entretanto, a produção e o comércio de produtos de origem animal informais constituem um desafio para os órgãos de fiscalização, visto que não atendem às diretrizes legais quanto ao controle de qualidade microbiológico, podendo veicular diversos microrganismos nocivos à saúde humana. Apenas a normatização da produção artesanal não garante uma melhoria na qualidade sanitária desses produtos, visto ser necessária a constante análise dos mesmos a fim de garantir que os limites microbiológicos sejam atendidos e a implementação de boas práticas de produção (MELO et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários e patogênicos em queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária e comercializados informalmente na região de Botucatu-SP, a fim de se conhecer o perfil epidemiológico desses microrganismos e inferir sobre o risco de surtos de DOA na região estudada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surtos de Doenças de Origem Alimentar

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), as Doenças de Origem Alimentar (DOA) estão entre as mais importantes causas de morbidade e mortalidade de humanos no mundo e surtos são frequentemente relatados (ARGUDÍN et al., 2010; HONISH et al., 2004; LE LOIR et al., 2003; SUZUKI et al., 2020). Segundo dados relatados pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2022), entre os anos de 2012 e 2021 foram notificados cerca de 6.000 surtos com 105 mil pessoas acometidas e mais de 80 mortes registradas. O estado de São Paulo concentra o mais alto número de notificações de surtos de DOA, o que pode ser justificado por um sistema de vigilância efetivo em comparação com outros estados; contudo a real incidência dessas doenças no Brasil é desconhecida devido a frequente subnotificação de casos, geralmente leves e auto limitantes (GARCIA; DUARTE, 2014).

Diversos alimentos são relatados como veículos de patógenos ou toxinas de origem alimentar, devido as características que favorecem o crescimento bacteriano, em especial o leite e seus derivados (DE BUYSER et al., 2001). Dentre os derivados lácteos, destacam-se os queijos, por serem produtos altamente manipulados e em alguns tipos, como os frescos, dispõem de elevados teores de umidade e nutrientes favorecendo o crescimento microbiano (AMARAL et al., 2020; AMORIM et al., 2014). Os queijos frescos são comumente produzidos a partir de leite cru e não sofrem o processo de maturação, propiciando maior potencial de risco de contaminação microbiológica seja pela qualidade sanitária inadequada da matéria-prima e/ou por falta de boas práticas de manipulação e armazenamento (BARANCELLI et al., 2011a; DA SILVA et al., 2015; MAKINO et al., 2005).

2.2 Produção queijeira e agricultura familiar

Das 223 mil toneladas de queijos produzidos pelo Brasil em 2017, cerca de 149 mil foram provenientes da agricultura familiar. Neste tipo de produção, o queijo fresco é muitas vezes produzido com o leite excedente da subsistência familiar e a sua venda de maneira informal gera maior retorno financeiro comparado à venda para grandes laticínios (IBGE, 2019; VINHA et al., 2016; EMBRAPA, 2021). Contudo, o leite obtido

em condições inadequadas de higiene somada a práticas sanitárias insatisfatórias, favorece que o queijo fresco seja um potencial veiculador de patógenos zoonóticos de origem alimentar (CAMARGO et al., 2021; VINHA et al., 2016). Diversos estudos corroboram a baixa qualidade sanitária de queijos frescos provenientes de agroindústrias familiares, relacionando infraestrutura precária de produção, favorecendo a contaminação cruzada com outros alimentos, com a ausência de conhecimento técnico de boas práticas de produção, manipulação e armazenamento (AMARAL et al., 2020; DA SILVA et al., 2015; KAMIMURA et al., 2019; VINHA et al., 2016, AMORIM et al., 2014).

Outro fator que parece favorecer o comércio informal de queijos é a preferência dos consumidores pelo sabor do queijo informal em comparação com o queijo industrializado e o desconhecimento do risco inerente ao consumo de produtos que não passam por nenhum tipo de fiscalização para garantir sua qualidade e higiene (AMORIM et al., 2014). Assim, o comércio informal de queijos frescos é uma atividade tradicional e comum em muitas cidades brasileiras, ocorrendo livremente sem o devido controle de qualidade, com os produtos sendo estocados sem correto controle de temperatura de refrigeração e acondicionados próximos a outros tipos de alimentos com risco de contaminação cruzada (VINHA et al., 2016; AMARAL et al., 2020).

A soma de inúmeras falhas na produção e conservação do queijo fresco informal associado a baixa qualidade sanitária da matéria prima colaboram para proporcionar condições favoráveis para a contaminação e conseqüente crescimento microbiano colocando em risco a segurança microbiológica do alimento e a saúde da população (AMORIM et al., 2014).

2.3 Legislação brasileira relacionada à produção de queijos

A fim de assegurar a qualidade sanitária dos alimentos produzidos e comercializados no Brasil, o governo federal instituiu diretrizes legais como a portaria nº 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) contemplando os produtos de origem animal como os queijos (BRASIL, 1996), assim como a IN nº 161 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) que regulamenta os limites microbiológicos aceitos para venda e varejo de produtos destinados ao consumo humano direto. Segundo a IN nº161, em queijos com umidade superior a 46% são aceitos limites de contagem de 3 log/g para *E.*

coli e *Staphylococcus* coagulase positiva, ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas do produto e inexistência de contagens de enterotoxinas estafilocócicas por grama de queijo.

O RTIQ (BRASIL, 1996) orienta que a produção de queijos seja realizada com matéria prima pasteurizada excetuando-se apenas os casos de queijos maturados por período mínimo de 60 dias, o que não contemplou grande parte da produção artesanal queijeira visto que alguns tipos de queijos passam por curtos períodos de maturação para atingirem qualidades organolépticas desejáveis e, caso sejam expostos a um período de maturação maior, podem apresentar sabor amargo e desagradável ao paladar do consumidor (KAMIMURA et al., 2019). Frente a essas limitações, foi instituída a Instrução Normativa nº30 de 2013 (MAPA) que permite períodos de maturação menores que 60 dias para queijos produzidos a partir de leite cru, desde que estudos técnicos científicos comprovem que tal procedimento não comprometa a qualidade e inocuidade do alimento.

A Instrução Normativa nº 79 (BRASIL, 2019), regulamenta sobre as boas práticas agropecuárias e delimita padrões de qualidade sanitária para a saúde do rebanho de origem da matéria prima, por exemplo o credenciamento da propriedade junto ao Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). No estado de São Paulo foi promulgada a Lei nº. 17.453/2021, contemplando os métodos de produção, comércio e inspeção de produtos artesanais; todavia, a informalidade do comércio prejudica o sistema de fiscalização (SÃO PAULO, 2021).

Em suma, ressalta-se a importância da inspeção sanitária com o objetivo de assegurar que o produto comercializado atenda aos parâmetros de segurança dos alimentos, minimizando a ocorrência de baixa qualidade higiênico-sanitária e favorecendo a inocuidade do alimento. É notório que a produção e o comércio de produtos de origem animal informais sejam um desafio para os órgãos de fiscalização, visto que não atendem às diretrizes legais quanto ao controle de qualidade microbiológico podendo veicular diversos microrganismos nocivos à saúde humana. Apenas a normatização da produção artesanal não garante uma melhoria na qualidade da segurança alimentar desses produtos, visto que para tal é necessário a adoção de boas práticas de fabricação associadas a análises laboratoriais de rotina a fim de averiguar se os limites dos parâmetros microbiológicos estão sendo respeitados e quando não atendidos, traçar estratégias para controle da contaminação e melhoria dos processos de produção (MELO et al., 2014).

2.4 Principais microrganismos em queijos

2.4.1 Bactérias ácido lácticas

Sob o ponto de vista tecnológico, é desejada a presença de determinados microrganismos em queijos, que podem estar presentes naturalmente na matéria-prima ou serem adicionados intencionalmente para contribuir com alterações organolépticas desejáveis ao produto. No entanto, de forma contrária, a presença elevada de microrganismos indesejáveis deve ser monitorada, como a presença de microrganismos indicadores de deterioração, indicadores de qualidade higiênico-sanitária ou mesmo patogênicos (KAMIMURA et al., 2019; CAMARGO et al., 2021).

A microbiota natural do queijo é composta por bactérias ácido lácticas (BAL), presentes no leite cru e que contribuem para o início da fermentação e coagulação do mesmo, além de auxiliarem no seu processo de maturação (DE ANTÔNIO; BORELLI, 2020). A produção de ácido láctico é sua principal característica, promovendo dessa forma a diminuição do pH, resultando na acidificação do meio que somado a produção de bacteriocinas, substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL e a competição da microbiota, promovem a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e favorecem a segurança microbiológica do produto (CAMARGO et al., 2021; KAMIMURA et al., 2019; REIS et al., 2012). Segundo Pehrson (2017), *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* são os gêneros de BAL mais prevalentes nos queijos.

Em estudo de Buyser et al. (2000), evidenciou-se o queijo como principal alimento veiculado a surtos de DOA ocorridos na França nas décadas de 80 e 90, destacando-se a identificação dos microrganismos *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como agentes patogênicos mais prevalentes responsáveis pelas ocorrências. Loir et al. (2003) também elencaram tais patógenos com a ocorrência de surtos no mesmo país entre 1999 a 2000. Gould et al. (2014) relacionaram a ocorrência de surtos de DOA com o consumo de queijos informais produzidos com leite cru nos Estados Unidos.

De 2000 a 2010 somente no estado de São Paulo foram reportados 239 surtos de gastroenterites por lácteos sendo que apenas em 79 foi possível veicular o agente causal

(MERUSSI et al., 2013). Outros estudos relatam a ocorrência de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Bacillus cereus* e *Coxiella burnetii* em queijos demonstrando o potencial risco zoonótico (DE MELO et al., 2014; MIONI et al., 2019; MORICONI et al., 2018; ROCHA et al., 2014; ROZENTAL et al., 2020).

2.4.2 *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium bovis e *Mycobacterium tuberculosis* são bactérias pertencentes ao “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMT), microaerófilos, imóveis, não formadores de esporos, contudo apresentam uma parede celular rica em lipídeos e ácido micólico que lhes confere alta resistência ambiental e aos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro (MEGID, RIBEIRO e PAES, 2015).

Mycobacterium tuberculosis é o principal causador de tuberculose em humanos, no entanto *M. bovis* pode causar enfermidade idêntica, sendo transmitido pelo contato direto com animais doentes ou através da ingestão de leite cru e derivados lácteos produzidos com leite cru contaminado (KANIBE; PALMER, 2020; THOEN; LOBUE; DE KANTOR, 2006). *M. tuberculosis* pode ser transmitido também através de produtos lácteos caso o bovino tenha sido infectado pelo tratador portador de tuberculose (MEGID, RIBEIRO e PAES, 2015).

A tuberculose é uma doença zoonótica de caráter granulomatoso que pode se apresentar sob a forma pulmonar, com via de transmissão aérea, e extrapulmonar em decorrência principalmente da ingestão de leite e derivados lácteos contaminados e não pasteurizados (MEGID, RIBEIRO e PAES, 2015). Apesar da via de transmissão oral da tuberculose zoonótica ocorrer principalmente pela ingestão dos produtos lácteos, não há parâmetro oficial de detecção de *M. bovis* e *M. tuberculosis* em alimentos, demonstrando falhas na legislação que regulamenta a segurança de alimentos no Brasil (MESSELHÄUSSER et al., 2012; STARIKOFF et al., 2016).

Os fatores de risco associados a ocorrência de *M. bovis* e *M. tuberculosis* podem ser elencados como: contato com animal contaminado e/ou seus produtos alimentícios que podem decorrer da ocupação profissional do indivíduo ou hábitos alimentares de consumo de leite e derivados lácteos não pasteurizados (ROCHA et al., 2014). Silva et al. (2013) relacionaram o consumo de queijo produzido a partir de leite cru com a ocorrência de tuberculose zoonótica em seu estudo, assim como outros trabalhos demonstraram a viabilidade do *M. bovis* em queijos como exemplo de Cezar et al. (2016)

que detectaram a presença de *M. bovis* em três das 107 amostras de queijo coalho artesanal analisadas. Harris et al. (2007) isolaram *M. bovis* de queijos frescos provenientes do México que estavam sob suspeita de causar surtos de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos. Corroborando com os estudos anteriores, Silva et al. (2018b) destacaram que a tuberculose zoonótica é subestimada por muitos órgãos de vigilância sanitária ainda nos dias atuais e a mesma ainda ocorre com prevalência.

2.4.3 *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp. são cocos Gram-positivos agrupados sob a forma de cachos, anaeróbios facultativos, mesófilos, não formadores de esporos, que apresentam resistência a baixa atividade de água e a altas concentrações de NaCl e nitratos, o que favorece sua multiplicação em alimentos curados como alguns tipos de queijos maturados (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Toxinas pré-formadas no alimento contaminado por *S. aureus*, o principal representante do gênero, causam um quadro de intoxicação com presença de náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, em um curto período de incubação que varia de 30 minutos a 8 horas após a exposição, cessando os sintomas em no máximo 24 horas (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). A severidade da manifestação clínica e o período de incubação são variáveis dependendo da dose infectante e susceptibilidade do indivíduo (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Intoxicações causadas por *Staphylococcus* spp. são uma das DOA de ampla ocorrência em surtos relatados em todo o mundo, o que tem estimulado muitos pesquisadores a estudarem seus fatores de virulência tais como as enterotoxinas (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; DA SILVA ABREU et al., 2021; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; SUZUKI et al., 2020). Contaminações por *Staphylococcus* spp. superiores a 5 log UFC/g são capazes de produzir enterotoxinas a ponto de causar sintomas clínicos no consumidor, mesmo que o alimento em questão seja tratado termicamente uma vez que as enterotoxinas são proteínas termoestáveis; dessa forma, quando observadas tais contagens é indicada a análise da presença de enterotoxinas estafilocócicas no alimento (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; NIA et al., 2016; VINHA et al., 2016).

A legislação brasileira regulamenta somente padrões limítrofes de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e enterotoxinas estafilocócicas, todavia diversos

trabalhos demonstraram que as cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa também apresentam potencial produção de enterotoxinas (DA CUNHA et al., 2006; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; VASCONCELOS; LOURDES; SOUZA, 2010). Em 1999, Carmo et al. (2002) investigaram a ocorrência de dois surtos alimentares ocorridos em Minas Gerais que acometeram 378 indivíduos decorrente da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas de *S. coagulase* negativa que haviam contaminado queijo fresco e leite, ambos não pasteurizados.

Staphylococcus aureus é encontrado de forma comensal na pele e mucosas de humanos, onde pode ser carregado para os alimentos pelo contato manual e por meio de secreções respiratórias (FORSYTHE, 2013). Por outro lado, *S. aureus* é um importante patógeno causador de mastite clínica em vacas leiteiras podendo contaminar o queijo produzido a partir deste leite (CARDOZO et al., 2021; FÁVERO et al., 2015; GRISPOLDI et al., 2019; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Boas práticas de manipulação, controle da sanidade animal e resfriamento adequado do produto logo após o tratamento térmico são medidas preventivas e de controle para evitar a contaminação do alimento por *S. aureus* e suas enterotoxinas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

2.4.4 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um gênero bacteriano pertencente à família Enterobacteriaceae, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, a maioria das espécies apresenta mobilidade e não formam esporos, característica que lhes confere baixa termorresistência (JAY, 2003).

O gênero *Salmonella* é dividido em 2 espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo ainda subdivididos em mais de 2.600 sorovares segundo seus antígenos de superfície, todos com potencial patogênico em humanos, entretanto apenas 200 sorovares têm importância clínica (FORSYTHE, 2013). A legislação brasileira através da IN nº 161 (BRASIL, 2022) preconiza ausência de *Salmonella* spp. em amostras de 25 g de queijo independente do sorovar envolvido.

Segundo Forsythe (2013), a dose infectante de *Salmonella* spp. capaz de manifestar sintomas clínicos é de 5 log UFC do microrganismo por via oral, pois apresenta sensibilidade ao pH ácido estomacal.

Salmonella spp. é o agente causador da febre tifoide, da febre entérica e da salmonelose de acordo ao sorovar envolvido (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A febre tifoide é causada pela *S. Typhi* e apresenta sintomas mais graves como septicemia, febre,

vômitos e diarreia (FORSYTHE, 2013). A invasão no organismo hospedeiro se dá através da expressão de fatores de virulência do patógeno que levam a formação de pseudópodos pelas células epiteliais intestinais onde a bactéria está aderida com seu sistema secretor do tipo III ativado, promovendo alterações funcionais no enterócito com rearranjo dos microfilamentos de actina para formação do vacúolo endocítico (DOYLE E BUCHANAN, 2013). O sistema de secreção tipo III também evita a fusão lisossomal ao vacúolo endocítico, ocorrendo a multiplicação bacteriana intracelularmente e posterior lise celular do enterócito (FORSYTHE, 2013). Os lipopolissacarídeos presentes na membrana externa da *Salmonella* spp. induzem resposta inflamatória local com recrutamento de macrófagos que fagocitam a bactéria e acabam morrendo em consequência da multiplicação bacteriana em seu interior, promovendo assim a dispersão do patógeno na corrente sanguínea e a ocorrência de septicemia (FORSYTHE, 2013).

A febre entérica se assemelha a febre tifoide, porém com sinais clínicos mais brandos e tempo de duração menor, no máximo 3 semanas, enquanto na febre tifoide pode se estender por até 8 semanas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As salmoneloses são infecções causadas pela multiplicação da *Salmonella* spp. limitada à lâmina própria do epitélio intestinal, manifestando sintomas locais como diarreia, vômito, dores abdominais e febre com período de incubação de 12 a 36 horas e duração dos sintomas de 1 a 4 dias (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A frequência de surtos alimentares de salmonelose associados aos produtos lácteos é baixa, sendo mais recorrente em ovos e carnes, especialmente de frangos (BYUSER et al., 2001; FORSYTHE, 2013). Convém lembrar que a competição com demais microrganismos, como as bactérias ácido lácticas, pode inibir o desenvolvimento de patógenos como *Salmonella* spp. nos queijos (KAMIMURA et al., 2019; CAMARGO et al., 2021).

Contudo, diversos estudos conseguiram isolar *Salmonella* spp. em queijos, como Cardozo et al. (2021) que isolaram a referida bactéria em 16,2 % dos queijos produzidos com leite cru comercializados em Jaboticabal/SP e Aracajú/SE, reafirmando a importância dos derivados lácteos na veiculação do patógeno e a necessidade da pasteurização para melhorar a segurança sanitária do alimento. De forma similar, Garcia et al. (2016) obtiveram 63 % de prevalência no isolamento de *Salmonella* spp. em seu estudo que abordou a análise de 18 queijos frescos artesanais da região norte do estado de Minas Gerais. Ainda em outro estudo brasileiro realizado com queijos frescos provenientes de produção industrial e informal da região da zona da mata mineira, Souza

et al. (2017) encontraram uma alta prevalência de 40% de *Salmonella* spp., correspondendo a 20 queijos dos 50 analisados no estudo.

Merussi et al. (2012) realizaram levantamento dos surtos alimentares ocorridos no estado de São Paulo entre os anos de 2000 e 2010; sendo que quando foi possível identificar o microrganismo causador do surto, observou-se maior prevalência de casos envolvendo *Salmonella* spp. como o agente etiológico.

O tratamento térmico dos alimentos, como a pasteurização, assim como a adoção de boas práticas de manipulação evitando-se a contaminação cruzada entre os alimentos constituem medidas de controle e prevenção eficientes contra a contaminação por *Salmonella* spp. (DOYLE E BUCHANAN, 2013)

2.4.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, ubíquo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, móvel, mesófilo com característica psicrotrófica e suporta congelamentos e descongelamentos repetidos (BARANCELLI et al., 2011). O patógeno tolera altas concentrações de NaCl e baixa atividade de água, além de apresentar capacidade de produção de biofilme, características que lhe conferem resistência ambiental (SILVA et al., 2018a).

Listeria monocytogenes causa doença alimentar atípica denominada listeriose que pode se apresentar de duas formas distintas, uma mais branda, conhecida como não invasiva, na qual predominam sintomas gastrointestinais e/ou gripais que muitas vezes passam despercebidos, e uma forma mais agressiva denominada invasiva que pode resultar em meningite, aborto ou septicemia (FDA, 2022). O período de incubação da listeriose é bastante variável, podendo durar de 1 a 90 dias, dificultando sua identificação como agente causador, assim como o rastreamento do alimento e a origem da contaminação (SILVA et al., 2010; BARANCELLI et al., 2011). Uma vez dentro do trato gastrointestinal, seu mecanismo de ação se dá com a invasão do epitélio intestinal, logo sendo fagocitado por macrófagos, após ocorre rompimento dos fagossomos no interior dessas células por ação da listeriolisina com multiplicação dentro da célula de defesa, induzindo a polimerização dos filamentos de actina da célula invadida para infectar novas células subjacentes, dando sequência a invasão do hospedeiro (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Listeria monocytogenes tem sido motivo de preocupação das indústrias de alimentos, em especial para a indústria de lácteos em vista de sua característica psicrotrófica e potencial produção de biofilme (DOYLER e BUCHANAN, 2013). Reiterando o problema do patógeno na cadeia produtiva do leite e derivados, Apolinário et al. (2014) detectaram incidência de 9,6 % de *L. monocytogenes* em queijos frescos produzidos em diferentes indústrias inspecionadas na zona da mata mineira. Barancelli et al. (2011) realizaram levantamento de literatura científica referente a ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e derivados no Brasil entre os anos de 2000 a 2009 encontrando prevalência variável de 0,1 % a 48,3 %.

Os surtos causados por *L. monocytogenes* são alarmantes apresentando altas taxas de mortalidade, em torno de 20 a 30 %, no entanto em casos graves pode alcançar 80 % dependendo do grupo de risco acometido (SOUZA et al., 2021). Apesar da detecção de *L. monocytogenes* em queijos e outros alimentos ter sido descrita na literatura científica nacional, não há dados sobre a ocorrência de surtos de listeriose, o que pode sugerir que a doença é subnotificada no país (SILVA et al., 2011; BARANCELLI et al., 2013). Em contrapartida com a aparente ausência de listeriose no Brasil, entre os anos de 2009 a 2020, somente nos Estados Unidos, foram relatados 80 surtos de listeriose com mais de 700 hospitalizações e 128 mortes (CDC, 2022).

2.4.6 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria mesófila Gram-positiva, aeróbia facultativa e produtora de esporos, sendo considerada importante deteriorante, pois apresenta características termodúrica e psicrotrófica, além de produzir lipases e proteases que interferem na qualidade do alimento (FOURSYTHE, 2013).

Bacillus cereus é o agente patogênico responsável pela ocorrência de duas DOA, a síndrome emética, que é uma intoxicação resultante da ingestão de toxina pré-formada no alimento, e a síndrome diarreica, que consiste numa intoxicação causada por toxina formada em decorrência da multiplicação do microrganismo no trato intestinal (DIETRICH et al., 2021; FORSYTHE, 2013; MAZIERO, M. T.; BERSOT, 2011). Os sinais clínicos de ambas as síndromes persistem por cerca de 24 horas, sendo que na síndrome diarreica são caracterizados por diarreia profusa com dores abdominais num período de incubação de 8 a 16 horas, enquanto a síndrome emética apresenta período de

incubação curto de 1 a 5 horas e manifestações clínicas como vômito e náuseas, podendo ocorrer diarreia também (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Vários fatores de virulência são produzidos por *B. cereus*, entretanto duas proteínas apresentam destaque por estarem envolvidas na ocorrência das síndromes anteriormente descritas, a toxina emética e a toxina diarreica. A toxina emética possui baixo peso molecular, apresenta termorresistência e é liberada em grandes quantidades no alimento durante a morte bacteriana. Por outro lado, a toxina diarreica possui alto peso molecular, sensível a altas temperaturas, tem potencial necrótico e é produzida durante a fase logarítmica da multiplicação bacteriana (FRANCO e LANDGRAF, 2008; FORSYTHE, 2013).

Diversos alimentos têm sido relatados como veiculadores de *B. cereus*, pois o microrganismo é amplamente distribuído na natureza onde contamina vegetais, cereais e inclusive o leite e derivados em decorrência da contaminação dos tetos sujos, pasto e o ambiente da sala de ordenha (MAZIERO e BERSOT, 2011; DOYLE e BUCHANAN, 2013). A contaminação dos alimentos acontece na maior parte das vezes pela contaminação cruzada com outros alimentos, podendo ocorrer também por presença de biofilmes em utensílios e equipamentos (MENDES; COELHO; DE AZEREDO, 2011).

Segundo Soares et al. (2005), alimentos contaminados a partir de 10^5 células viáveis/g têm o potencial de causar DOA, entretanto Doyle e Buchanan (2013) referenciaram que a partir de 10^3 células viáveis/g são suficientes para causar manifestação clínica.

De 2009 a 2020 nos Estados Unidos, o CDC (2022) notificou 22 surtos associados ao consumo de queijo contaminado com *Bacillus cereus*. Segundo Lentz et al. (2018), *B. cereus* é o quarto maior causador de surtos no Brasil, sendo o patógeno mais prevalente em seu estudo conduzido na cidade de Porto Alegre/RS, entretanto os surtos de *B. cereus* são aparentemente subestimados devido a manifestação curta e autolimitante da doença na maioria dos casos (DOYLE e BUCHANAN, 2013).

Apesar dos prejuízos para a indústria de alimentos e o risco para a saúde pública, a legislação brasileira é omissa no que diz respeito a regulamentação de parâmetros de contagem para *Bacillus cereus* em queijos, apenas determinando valores para sobremesas lácteas e molhos a base de lácteos (BRASIL, 2019).

Medidas de controle como correta manipulação do alimento a fim de assegurar sua qualidade sanitária e prevenir contaminação cruzada entre os alimentos associado ao controle de temperatura de cocção e posterior refrigeração, evitando manter o alimento a

temperatura ambiente para prevenir a germinação dos esporos, são condutas relevantes para diminuir o risco de alta carga de esporos no alimento e subsequente risco de ocorrência de DOA (FORSYTHE, 2013).

2.4.7 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria da família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, não formadora de esporos e que pode estar envolvida na ocorrência de DOA dependendo da virulência da cepa envolvida (FORSETHY, 2013). A presença de *E. coli* em alimentos indica contaminação de origem fecal e conseqüente falta de higiene na manipulação ou matéria prima obtida em más condições sanitárias. A presença do microrganismo também pode ser um indicador de patogenicidade já que diversas estirpes de *E. coli* causam doença em seres humanos (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A contagem de coliformes termotolerantes anteriormente exigida pela legislação brasileira foi substituída pela contagem de *E. coli*, pelo fato de algumas cepas de *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp. não terem origem fecal (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006).

Conforme seus mecanismos de patogenicidade e sintomas clínicos, *E. coli* patogênicas podem ser agrupadas em: enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enteroagregativas (EAEC), difusamente adesivas (EA_ggEC) e enterohemorrágicas (EHEC) (Forsythe, 2013).

EPECs são importantes patógenos causadores de gastroenterites em recém-nascidos e lactentes, que podem apresentar diarreia aquosa, vômito, dores abdominais e febre com período médio de incubação de 36 horas e duração média dos sintomas de 24 horas (FRANCO e LANDGRAF, 2008). A EPEC promove adesão localizada à mucosa intestinal, com posterior destruição das microvilosidades intestinais pela indução de alterações no citoesqueleto da célula epitelial (FORSYTHE, 2013).

ETEC causa a doença conhecida como diarreia do viajante, aderindo e colonizando a parte proximal do intestino delgado pela ação de suas fímbrias, e produzindo enterotoxinas que resultam num quadro de diarreia aquosa com febre baixa (FRANCO e LANDGRAF, 2008; FORSYTHE, 2013).

EIEC invade a mucosa do colón se espalhando lateralmente para as células subjacentes resultando em diarreia muco sanguinolenta e febre, quadro clínico similar a

doença causada por *Shigella* spp., todavia não há produção de toxinas, o que a diferencia da infecção causada por este microrganismo (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

EHEC está relacionada a ocorrência de colite hemorrágica que pode evoluir para síndrome hemolítica urêmica (SHU). Os sintomas são diarreia sanguinolenta profusa, cólicas abdominais e vômito sem presença de febre e com período de incubação médio de 4 dias, sendo que os sintomas podem persistir por até 9 dias. Seu mecanismo de patogenicidade envolve a produção de citotoxinas, quase idênticas a shiga toxina, além de ativação do sistema de secreção tipo III que junto com receptores translocados de intimina promovem a formação de pedestal no lugar das microvilosidades do enterócito. As toxinas causam morte celular na região do colón e podem causar danos aos rins, pâncreas e cérebro; sendo que o acúmulo de células mortas com consequente bloqueio nos rins causa a SHU. Pode ocorrer também o quadro de púrpura trombótica trombocitopênica (TTP) em adultos saudáveis ocasionando danos ao sistema nervoso central e rins. A maior parte dos surtos é causada por *E. coli* O157:H7 que é a estirpe de maior importância e pode ser transmitida pela ingestão de leite cru e seus derivados, como os queijos (FORSYTHE, 2013).

EAEC apresenta mecanismo de adesão agregativa às células do intestino delgado, não promovendo a invasão celular nem modificações estruturais das células em que se aderem, entretanto secreta toxinas e causa quadros crônicos de diarreia (FORSYTHE, 2013).

A prevalência de *E. coli* comensal em queijos foi descrita por Melo et al. (2013) e Scher et al. (2018) onde encontraram contagens acima do permitido pela legislação para tal microrganismo em 59,2 % e 73,3 % respectivamente dos queijos analisados em seus trabalhos.

2.4.8 *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii é o agente etiológico da Febre Q, uma zoonose que foi descrita pela primeira vez em 1935 na Austrália acometendo trabalhadores de um frigorífico local (MAURIN; RAOULT, 1999). O microrganismo tem por característica ser uma bactéria Gram-negativa que se apresenta sobre duas formas celulares, a *Small Cell Variant* (SCV) forma de resistência ao ambiente, e a *Large Cell Variant* (LCV) que é a forma de multiplicação intracelular, ou seja, não ocorre crescimento bacteriano no leite ou derivados (GALE et al., 2015).

C. burnetii infecta diversos hospedeiros desde animais domésticos, de produção, selvagens, humanos e inclusive artrópodos hematófagos. Os ruminantes têm sido associados como principais fontes de infecção (FI) para o homem devido a aspersão de bactérias no ambiente, no entanto bovinos são importantes dispersores também servindo de FI para humanos. sendo que os carrapatos possuem papel importante na contaminação desses animais (MAURIN; RAOULT, 1999).

A principal via de transmissão de *C. burnetii* em humanos é a via aérea pela inalação de aerossóis que podem estar contaminados a partir de 1 célula viável da bactéria (CDC, 2019). A transmissão oral é questionada por alguns estudos que não encontraram evidências de ocorrência de infecção pós ingestão de alimentos, geralmente lácteos, contaminados pelo patógeno, entretanto estudo de Miller et al. (2020) demonstraram manifestação clínica, soroconversão e disseminação do patógeno nos tecidos de cobaias em decorrência da administração por sondagem oral de cepas de *C. burnetii*.

As principais manifestações clínicas incluem febre alta, pneumonia e hepatite, contudo a Febre Q geralmente se apresenta na forma aguda assintomática ou autolimitante com sintomas inespecíficos como febre alta, fraqueza e dores de cabeça; e a forma crônica que pode levar de meses a anos para se manifestar. A forma crônica pode evoluir para um quadro de endocardiose das válvulas cardíacas constituindo o agravo mais severo e fatal da doença (MAURIN; RAOULT, 1999).

Nos animais *C. burnetii* causa doença conhecida por Coxielose acometendo o tecido uterino e mamário dos animais podendo causar problemas reprodutivos, inclusive abortamentos, além de contaminar o leite produzido (MAURIN; RAOULT, 1999).

Segundo Mioni et al. (2019) desde 2013 a notificação de casos de coxielose são de notificação obrigatória no Brasil, embora não exista nenhum programa de controle da doença como o exemplo do PNCEBT para brucelose e tuberculose. A notificação de febre Q em nosso país passou a ser obrigatória a partir de 2014, mesmo assim os casos da doença seguem sendo subnotificados (MARES-GUIA et al., 2016).

2.4.9 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. é um bastonete Gram-negativo, aerófilo, psicrotrófico, não formador de esporos de ampla distribuição ambiental (ARSLAN; EYI; ÖZDEMIR, 2011). As bactérias desse gênero têm papel relevante como microrganismo deteriorante dos alimentos, em especial os queijos, devido a produção de enzimas que ocasionam

alterações deletérias no sabor, odor e coloração dos produtos (RODRIGUES et al., 2021). A produção de biofilme é um mecanismo de adaptação e propagação da bactéria, dificultando seu controle. Os mecanismos de ação para que a deterioração do alimento ocorra envolvem proteases termoestáveis e enzimas lipolíticas além da biossíntese de pigmentos por algumas espécies.

A deterioração é um grave problema para a indústria alimentícia e *Pseudomonas* spp. são responsáveis por grandes prejuízos, resultando em torno de 25 a 30 % de desperdício dentro da cadeia leiteira, sendo considerado o principal microrganismo deteriorante em ambientes de processamento de alimentos (ARSLAN; EYI; ÖZDEMIR, 2011; QUINTIERI; FANELLI; CAPUTO, 2019).

Para a saúde pública, *Pseudomonas* spp. constitui um microrganismo oportunista que pode estar envolvido na ocorrência de infecções em crianças, idosos e imunocomprometidos, tendo sido relacionado a surtos de origem alimentar no estado de São Paulo, mesmo que em baixa prevalência (MERUSSI et al., 2012; CAPODIFOGGIO et al., 2016). Segundo De Paula et al. (2021), o impacto da *Pseudomonas* spp. na saúde pública é subestimado. Quintieri et al. (2019) reiteraram que produtos lácteos podem ser potenciais fontes de transmissão de cepas multidroga resistentes (MDR) desse microrganismo.

Estudo de Okuno et al. (2021) detectou *Pseudomonas* spp. em 57,6 % dos queijos frescos analisados oriundos do Rio de Janeiro, reiterando a necessidade de melhores abordagens sanitárias para o devido controle do microrganismo. Em estudo realizado por Paula et al. (2021) para verificar a microbiota do queijo fresco, foi observado que dentre as variedades de espécies bacterianas, *Pseudomonas* spp. foi o microrganismo mais prevalente. Teider et al. (2019) detectaram contagens médias de *Pseudomonas* spp. de $6,86 (\pm 18,6) \times 10^5$ UFC/g em queijos frescos comercializados formalmente e de $2,08 (\pm 3,65) \times 10^6$ UFC/g para queijos frescos comercializados informalmente, ambos comercializados na cidade de Londrina/PR. Desse modo, medidas de controle eficientes se baseiam na correta higienização e sanitização dos equipamentos a fim de eliminar a formação de biofilmes (FORSYTHE, 2013).

3 OBJETIVOS

Pesquisar a qualidade e segurança microbiológica de queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária obtidos de comércio informal das cidades de Botucatu e Pardinho, estado de São Paulo.

4 REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. W. et al. Avaliação da qualidade de queijos de produção informal. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, n. 61, p. e020016, 2020.
- AMORIM, A. L. B. DO C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, 2014.
- ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751–1773, 2010.
- ARSLAN, S.; EYI, A.; ÖZDEMİR, F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5851–5856, 2011.
- BARANCELLI, G. V. et al. *Listeria Monocytogenes*: Ocorrência Em Produtos Lácteos E Suas Implicações Em Saúde Pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011a.
- BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 816–819, 2011b.
- BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Igarss 2014**, n. 1, p. 1–5, 2014.
- CAMARGO, A. C. et al. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393–409, 2021.
- CAPODIFOGGIO, E. et al. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5214–5223, 2016.
- CARDOZO, M. V. et al. Raw milk cheese as a potential infection source of pathogenic and toxigenic food born pathogens. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, n. 2, p. 355–358, 2021.

- CARVALHO, P. L. N. et al. Research about *Listeria* Sp., *Salmonella* Sp. and others contamination indicators to milk's and cheese's samples sale in the south of minas gerais state. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 4422–4431, 2009.
- CEZAR, R. D. S. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 3, p. 269–272, 2016.
- DA CUNHA, M. D. L. R. D. S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 70–74, 2006.
- DA SILVA ABREU, A. C. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4012–4022, 2021.
- DA SILVA, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados no sudoeste do paraná. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 33–44, 2015.
- DE ANTÔNIO, M. B.; BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204–221, 2020.
- DE BUYSER, M. L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1–2, p. 1–17, 2001.
- GUIMARÃES, F. F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866–2872, 2013.
- DE MELO, C. B. et al. Profile of international air passengers intercepted with illegal animal products in baggage at Guarulhos and Galeão airports in Brazil. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2014.
- DE PAULA, A. C. L. et al. Microbiome of industrialized Minas Frescal Cheese reveals high prevalence of putative bacteria: A concern in the One Health context. **Lwt**, v. 139, n. 110791, p. 1–8, 2021.
- DIETRICH, R. et al. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. **Toxins**, v. 13, n. 2, 2021.
- DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4º ed. Washington: ASM Press, 2013. 1118p.

FABER, J.M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, 1991.

FÁVERO, S. et al. Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. **Livestock Science**, v. 181, p. 220–230, 2015.

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

GALE, P. et al. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1083–1095, 2015.

GARCIA, D.; DUARTE, D. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 6, n. 1, p. 545–554, 2014.

GOULD, L. H.; MUNGAI, E.; BARTON BEHRAVESH, C. Outbreaks attributed to cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 7, p. 545–551, 2014.

GRISPOLDI, L. et al. Short communication: Characterization of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 1059–1065, 2019.

HARRIS, N. B. et al. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1025–1028, 2007.

HONISH, L. et al. An Outbreak of *E. coli* O157:H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. **Revue Canadienne de Sante Publique**, v. 96, n. 3, p. 182–184, 2004.

IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo agropecuário**, v. 8, n. 0103–6157, p. 1–105, 2019.

KABUKI, D. Y.; SOUZA, R. M. DE; KUAYE, A. Y. *Bacillus cereus* potencialmente enterotoxigênico em queijos minas frescal produzidos por diferentes processos tecnológicos. **Sínteses: Revista Eletrônica do SIMTEC**, v. 0, n. 2, p. 140–140, 2008.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019.

KANIPE, C.; PALMER, M. V. *Mycobacterium bovis* and you: A comprehensive look at the bacteria, its similarities to *Mycobacterium tuberculosis*, and its relationship with human disease. **Tuberculosis**, v. 125, n. September, p. 102006, 2020.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.

LENTZ, S. A. M. et al. *Bacillus cereus* como principal agente etiológico em surtos de intoxicação alimentar no sul do Brasil: Dados de 11 anos. **Cadernos de Saude Publica**, v. 34, n. 4, p. 1–9, 2018.

MAKINO, S. I. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 189–196, 2005.

MARES-GUIA, M. A. M. M. et al. Molecular identification of Q fever in patients with a suspected diagnosis of dengue in Brazil in 2013–2014. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1090–1094, 2016.

MAURIN, M.; RAOULT, D. Q fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 518–553, 1999.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. *Bacillus Cereus* Em Produtos Lácteos - Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 381, p. 5–10, 2011.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Journal of Environmental Health**, v. 62, n. 7, p. 9–18, 2000.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia**. 1º ed. Botucatu-SP: Editora Roca, 2015. 1296p.

MELO, F. D. et al. Evaluation of the Safety and Quality of Microbiological Handmade Cheese Serrano and its Relation to Physical and Chemical Variables the Period of Maturity. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, 2013.

MENDES, R. A.; COELHO, A. Í. M.; DE AZEREDO, R. M. C. Contaminação por *Bacillus cereus* em superfícies de equipamentos e utensílios em unidade de alimentação e nutrição. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3933–3938, 2011.

MESSELHÄUSSER, U. et al. Culture and molecular method for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and dairy products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 295–297, 2012.

MIONI, M. R. S. et al. Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. **Zoonoses and Public Health**,

v. 66, p. 695-700, 2019.

MORICONI, P. R. et al. Mycobacteria in minas cheese commercialized in open fairs in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 1–11, 2018.

NIA, Y. et al. Review over a 3-year period of european union proficiency tests for detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices. **Toxins**, v. 8, n. 4, 2016.

OKUNO, N. T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *pseudomonas* spp. Isolated from fresh minas cheeses in Rio de Janeiro. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, v. 08, n. 1, p. 12–27, 2021.

PEHRSON, M. E. DE S. F. **Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de Queijo Artesanal das Terras Altas da Mantiqueira**. 2017. 128f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

QUINTIERI, L.; FANELLI, F.; CAPUTO, L. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. **Foods**, v. 8, n. 9, p. 1–32, 2019.

RAMOS, S. et al. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. **Animals**, v. 10, n. 2239, p. 2–15, 2020.

REIS, J. A. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

ROCHA, B. B. et al. Prevalência e fatores associados ao consumo de queijo não pasteurizado entre pacientes com tuberculose de uma área urbana do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 96–100, 2014.

RODRIGUES, R. DA S. et al. *Pseudomonas* sp. as the causative agent of anomalous blue discoloration in Brazilian fresh soft cheese (Minas Frescal). **International Dairy Journal**, v. 117, 2021.

ROZENTAL, T. et al. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 208–212, 2020.

SCHER, D. D. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. em queijos do tipo minas frescal comercializados em feiras livres e supermercados no oeste do Paraná. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 9, n. 4, p. 105, 2018.

SILVA, J. F. M. et al. Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos de intoxicação

alimentar. **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 5, n. 2, p. 30–40, 2018a.

SILVA, M. P. et al. Coliforms at 45°C and comparison of most probable number method and petrifilm EC for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* of foods. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 352–359, 2006.

SILVA, M. R. et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 321–327, 2013.

SILVA, M. R. et al. Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an urban area of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, p. 1–6, 2018b.

SIMEÃO DO CARMO, L. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9–14, 2002.

SOUZA, N. F. D. et al. Principais aspectos de *Listeria monocytogenes* e sua importância para a saúde pública. **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 4, p. 264, 2021.

STARIKOFF, K. R. et al. Decline in *Mycobacterium bovis* and *Brucella abortus* populations during the maturation of experimentally contaminated parmesan-type cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3743–3758, 2016.

ARNESEN, L. P. S. et al. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 579–606, 2008.

SUZUKI, Y. et al. A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. **Food Microbiology**, v. 92, n. June, p. 103588, 2020.

TEIDER, P. I. et al. *Pseudomonas* spp. and other psychrotrophic microorganisms in inspected and non-inspected Brazilian Minas Frescal cheese: Proteolytic, lipolytic and AprX production potential. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 807–815, 2019.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 2- 4 SPEC. ISS., p. 339–345, 2006.

VASCONCELOS, N. G.; LOURDES, M. DE; SOUZA, R. DE. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. **Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 2, p. 29–42, 2010.

VINHA, M. B. et al. Qualidade de queijos minas frescal produzidos e comercializados informalmente em agroindústrias familiares. **Revista Brasileira de Agropecuária**

Sustentável, v. 6, n. 4, 2016.

WHO. **Third meeting of the Foodborne Burden Disease Epidemiology Reference Group (FERG2) 2021-2024**. May, 2022, Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/04/26/default-calendar/third-meeting-of-the-foodborne-disease-epidemiology-reference-group-\(ferg2\)-2021-2024](https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/04/26/default-calendar/third-meeting-of-the-foodborne-disease-epidemiology-reference-group-(ferg2)-2021-2024)>. Acesso em: 28/05/2022.

CAPÍTULO II

Artigo científico a ser submetido para a Revista Ciência Rural

Listeria monocytogenes, Coxiella burnetii and Bacillus cereus in not inspected fresh cheese illegally marketed in São Paulo, Brazil

Listeria monocytogenes, Coxiella burnetii e Bacillus cereus em queijos frescos não-inspecionados comercializados ilegalmente em São Paulo, Brasil

Ana Carolina de Sá¹, Juliano Gonçalves Pereira¹, Antonio Carlos Paes¹

ABSTRACT

Cheeses are very susceptible to microbial contamination and can carry pathogens and/or toxins that cause foodborne diseases, including zoonoses. This study aims to investigate the prevalence of hygienic-sanitary and pathogenic indicator agents in fresh cheeses from informal production. Samples of 51 fresh cheeses produced without sanitary inspection and informally marketed were analyzed for *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus coagulase positive*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Coxiella burnetii* by microbiological and biomolecular analysis. Among the cheeses analyzed were found *Listeria monocytogenes* serotype 4b in one sample (1,96%), *Bacillus cereus* in two (3,92%), *Coxiella burnetii* in four (7,84%). In 28 samples (54,9%) the *Escherichia coli* count was higher than permitted by law as well as in 23 samples (45,09%) the coagulase positive *Staphylococcus* count was above the microbiological limit regulated by IN nº161. The large number of samples in disagreement with the legislation is an alarming fact

¹Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu (UNESP), Distrito de Rubião Jr, SN, Botucatu, São Paulo, CEP 18618-681, Brasil. E-mail: ac.sa@unesp.br. Autor para correspondência.

demonstrating the risk that the trade in these cheeses can bring to public health. Greater rigor in the inspection of the trade of informal fresh cheeses is necessary since such a product can be an aggravating factor for the occurrence of outbreaks foodborne diseases.

Key words: foodborne diseases, milk and derivatives, microbiology, PCR

RESUMO

Os queijos são alimentos propensos à contaminação microbiana e podem veicular patógenos e/ou toxinas causadores de doenças de origem alimentar (DOA), inclusive zoonoses. Este estudo visa pesquisar a prevalência de agentes indicadores higiênico-sanitário e patogênicos em queijos frescos oriundos de produção informal. Amostras de 51 queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária e comercializados informalmente foram analisados para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii* por meio de análises microbiológicas e biomoleculares. Entre os queijos analisados foi detectado *Listeria monocytogenes* sorotipo 4b em uma amostra (1,96%), *Bacillus cereus* em duas amostras (3,92%), *Coxiella burnetii* em quatro amostras (7,84%). Em 28 (54,9%) amostras a contagem de *Escherichia coli* foi superior ao permitido pela legislação assim como em 23 (45,09%) a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva se apresentou acima do limite microbiológico regulamentado pela IN nº161. O grande número de amostras em não conformidade com a legislação é um dado alarmante demonstrando o risco que o comércio desses queijos pode trazer para a saúde pública. Maior rigor na fiscalização do comércio de queijos frescos informais se faz necessário, visto que tal produto pode ser um fator agravante para a ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos.

Palavras-chave: doenças de origem alimentar, leite e derivados, microbiologia, PCR.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), as Doenças de Origem Alimentar (DOA) estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade de humanos no mundo todo e surtos relacionados ao consumo de leite e derivados lácteos, especialmente os queijos, são frequentemente relatados (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; HONISH et al., 2004; SUZUKI et al., 2020).

A cadeia produtiva de queijos tem diversas etapas que podem oferecer riscos de contaminação. Na obtenção da matéria prima, o leite utilizado pode sofrer contaminação por *Staphylococcus* spp., provenientes de mastites bovinas (ARGUDIN et al., 2010; LE LOIR et al., 2003). A utilização de leite cru e não pasteurizado, comum na produção de queijos informais, pode ser responsável pela veiculação de patógenos como *Coxiella burnetii* aos seres humanos (ROZENTAL et al., 2020; MIONI et al., 2019). Ainda, a contaminação cruzada com outros alimentos e a ausência de boas práticas de manipulação e conservação do queijo podem ocorrer durante toda sua produção, principalmente em produções familiares, favorecendo a disseminação de *Bacillus cereus* e de *Listeria monocytogenes*, por exemplo (BARANCELLI et al., 2011; MAZIERO e BERSOT, 2011).

No Brasil, cerca de aproximadamente 70% da produção de queijos provem da agricultura familiar onde a produção é, muitas vezes, realizada com o leite excedente da subsistência familiar e a sua venda de maneira informal gera um melhor retorno financeiro comparado à entrega do leite para laticínios (IBGE, 2019; VINHA et al., 2016; EMBRAPA, 2021). Entretanto, a infraestrutura deficiente de muitas propriedades associada, as inúmeras falhas na produção e conservação do queijo somados a má qualidade da matéria prima favorecem a contaminação microbiana colocando em risco a segurança microbiológica do alimento e a saúde dos indivíduos que o consomem

(AMARAL et al., 2020; DA SILVA et al., 2015; KAMIMURA et al., 2019; VINHA et al., 2016, AMORIM et al., 2014).

Programas como o Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) foram implementados no país afim de monitorar a sanidade animal melhorando a qualidade sanitária do leite produzido e somados a portarias e instruções normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determinam parâmetros microbiológicos e fiscalizam a produção de alimentos, regulamentam as boas práticas de fabricação, armazenamento e venda dos produtos de origem animal, auxiliando na busca pela produção de alimentos seguros (BRASIL, 2022; BRASIL, 2021; BRASIL, 2019). Entretanto, a informalidade é um desafio para o serviço de saúde pública nacional visto que ocorre livremente e em todo o país (AMARAL et al., 2020). A falta de conhecimento acerca dos riscos envolvidos no consumo de tais produtos, associada a questões culturais e ao preço baixo quando comparados com produtos industrializados, são características que favorecem o comércio informal de produtos de origem animal, dentre eles os queijos (AMORIM et al., 2014).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a qualidade microbiológica de amostras de queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária obtidos de comércio informal da região de Botucatu, estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Entre novembro de 2021 a março de 2022 foram adquiridos 51 queijos frescos não inspecionados, produzidos e comercializados informalmente por propriedades

leiteiras (n=16), estabelecimentos comerciais (n=23), e através de venda ambulante em feiras livres, venda pela internet, “carro de ovos” ou diretamente em residências (n=12) na região de Botucatu, estado de São Paulo. O produto foi acondicionado desde o momento de sua compra dentro de sacos plásticos transparentes de primeiro uso identificados em caixa térmica contendo gelo reciclável e transportado até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UNESP campus de Botucatu-SP para realização das análises.

Análises microbiológicas

Contagem de Bacillus cereus

Para a contagem de *Bacillus cereus* foi adotada a metodologia ISO 7932 (ISO, 2004). Foram pesadas 25 g das amostras e diluídas em 225 mL de Solução Salina 0,85%. Após diluições seriadas, alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram semeadas na superfície de placas contendo *Ágar Bacillus cereus* (BC) suplementadas com gema de ovo devidamente identificadas e incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 h. Foram selecionadas 5 colônias características de cada placa e submetidas a confirmação em placas de *Ágar sangue* mediante presença de β -hemólise. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Contagem de Escherichia coli

A contagem de *Escherichia coli* seguiu a metodologia ISO 16649 (ISO, 2001). Foram pesadas 25 g das amostras e diluídas em 225 mL de Solução Salina 0,85 %. Após as diluições seriadas, alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-1} e 10^{-3} foram inoculadas pela técnica de *pour plate* com o meio de cultura *Tryptone Bile X-glucuronide* (TBX) para contagem de *Escherichia coli*, posteriormente incubados $44^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h. Colônias

características foram submetidas a contagem e os resultados foram expressos em log UFC/g.

Contagem de Staphylococcus coagulase positiva

A contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* seguiu método ISO 6888-1 (ISO, 2003). Foram pesadas 25 g das amostras e diluídas em 225 mL de solução salina 0,85 %. Após diluições seriadas, alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram inoculadas na superfície de placas de *Baird-Parker Agar* (BP) suplementadas com gema de ovo e telurito de potássio e posteriormente incubadas a 35 ± 1 °C por 48 ± 2 h. De cada placa foram selecionadas 5 colônias típicas e 5 atípicas que foram submetidas ao teste da coagulase com plasma-EDTA para confirmação. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Contagem de Pseudomonas spp.

A contagem de *Pseudomonas sp.* foi realizada de acordo com a metodologia ISO 13720 (ISO, 2010) com modificações. Foram pesadas 25 g das amostras e diluídas em 225 mL de Solução Salina 0,85 %, após diluições seriadas, alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} foram inoculadas na superfície de placas com ágar *Cetrimide* e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 ± 2 h. Colônias características foram submetidas ao teste da oxidase para confirmação. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Pesquisa de L. monocytogenes

A pesquisa de *L. monocytogenes* seguiu a metodologia ISO 11.290-1 (ISO, 2017a) com modificações. Foram pesadas 25 g das amostras que foram enriquecidas com 225 mL de caldo de enriquecimento de *Listeria* (LEB) e posteriormente incubadas a

30±1°C/24h. Após incubação, 0,1 mL do caldo enriquecido com a amostra foi transferido para o caldo *Fraser*, sendo novamente incubado a 37±1°C/24-48h. A partir dos tubos com caldo *Fraser* que apresentaram hidrólise da esculina (escurecimento do caldo), foi realizada semeadura em placas de *Chromogenic Listeria Agar* (ALOA) e *Oxford Listeria Agar* (OXA), as quais foram incubadas a 37±1°C/48h. Colônias características foram selecionadas, purificadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA) com 0,6% *Yeast Extract* (YE) e submetidas à confirmação e identificação bioquímica (produção de β-hemólise, motilidade e fermentação dos carboidratos xilose, ramnose e manitol). Os resultados foram expressos em presença ou ausência em 25 g.

A confirmação molecular foi realizada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de acordo Doumith et al. (2004). Adicionalmente, o perfil de virulência foi realizado pela detecção genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hlyA* e *actA* proposto por Liu et al. (2007), Paziak-Domanska et al. (1999) e Suarez & Vazquez-Boland (2001).

Pesquisa de Salmonella spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com a ISO 6579 (ISO, 2017b) onde foram pesadas 25g das amostras e enriquecidas com 225 mL de *Buffered Peptone Water* (APT) sendo posteriormente incubadas a 37±1°C/18±2h. Após incubação, 1 mL do caldo enriquecido foi transferido para o caldo *Muller-Kauffmann Tetrathionat* (MKTT) e 0,1 mL para o caldo *Rappaport-Vassilidis Soya* (RVS), ambos foram incubados 41,5±1°C/24±3h. Posteriormente, uma alíquota de cada caldo de enriquecimento incubado foi estriada em placas contendo *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD) e *Bismuth Sulfite Agar* (BS), incubadas a 37±1°C/24±3h. Colônias características foram submetidas a provas bioquímicas (lisina, produção de H₂S, fermentação de açúcar, utilização de citrato, ureia, vermelho de metila, *Voges-Proskauer*,

produção de indol e motilidade). Os isolados de *Salmonella* spp. foram submetidos a sorotipificação de acordo com antígenos somáticos e flagelares. Os resultados foram expressos em presença ou ausência do patógeno em 25 g.

Deteção molecular de Coxiella burnetii

As amostras de queijo foram processadas usando o *Kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen®) seguindo o protocolo do fabricante para amostras de tecido. Para o preparo das amostras para extração foram pesados 10 gramas de queijo em tubo Falcon® de 50 ml, adicionaram-se 10 ml de solução PBS e macerou-se com auxílio de vórtex. Após, 200 µl desse macerado de queijo com PBS, foram adicionados a 180 µl de tampão ATL e 20 µl de Proteinase K, e foram incubados por 30 min a 70 'C'. Em seguida, 200 µl de etanol (96%-100%) foram adicionados à amostra e misturado completamente. As amostras foram transferidas para a coluna de spin *DNeasy Mini*, colocadas em um tubo coletor de 2 ml, centrifugadas a 6.000 G por 1 min e, em seguida, o resíduo do processo de filtração foi descartado. Adicionamos 500 µl de *Buffer AW1*, centrifugamos novamente por 1 min a 6.000 G e descartamos o resíduo do filtrado. Para completar a limpeza da amostra, 500 µl de *Buffer AW2* foram adicionados e centrifugados por 3 min a 20.000 G para secar a membrana *DNeasy*. Finalmente, colocamos a coluna em um tubo limpo de 1,5 ml e adicionamos 200 µl de *Buffer AE* (tampão de eluição) diretamente na membrana *DNeasy*. As amostras foram então incubadas à temperatura ambiente por 1 min e depois centrifugadas por 1 min a 6.000 G para eluir.

A amplificação para detecção de *C. burnetii* seguiu o protocolo de Vaidya et al. (2010) utilizando os primers Trans 3 (5'-GTAACGATGCGCAGGCGAT-3') e Trans 4 (5'-CCACCGCTTCGC TCGCTA-3') (Hoover, Vodkin, & Williams, 1992). Resumidamente, a PCR foi executada em um volume total de 25 µl, contendo 32 nM de cada primer, 12,5

μl de SYBR Green™ Dye GoTaq™ qPCR Master Mix (Promega), 6,7 μl de água de grau PCR sem nuclease e 5 μl de molde de DNA. O ensaio qPCR foi realizado em um Real-Time Applied Biosystems™ Step-One (modelo ABI 7500 Fast), com o ciclo padrão de 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 30 s, 61°C por 30 s e 72°C por 1 min. A fluorescência foi registrada no ponto final de cada ciclo, e a análise da curva de dissociação consistiu em 95°C por 30 s, seguido de 61°C por 30s e aumento gradual até 95°C a 2°C/min. Como controle positivo, utilizou-se DNA de uma cepa de *C. burnetii* isolada de carrapatos argentinos (Pacheco et al., 2013) que, após a conclusão da curva de dissociação, registrou a temperatura de fusão de 86,91°C.

Foi realizado simultaneamente à amplificação de β-actina como controle da reação. Após, as cepas positivas de *C. burnetii* foram submetidas a eletroforese considerando-se positividade quando o peso molecular da amostra coincidiu com a banda 243 pb.

Deteção molecular de Mycobacterium bovis e Mycobacterium tuberculosis

O preparo das amostras de queijos para a extração foi realizado pesando-se 10 gramas de cada amostra em saco estéril tipo *Stomacher*®, no qual foram adicionados 10 ml de solução salina estéril e em seguida homogeneizado manualmente para dissolução do conteúdo. Para extração do DNA das amostras de queijos, foram processados 200μL do sobrenadante de cada amostra diluída conforme descrito anteriormente e utilizado o kit *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit* (ThermoFisher®) seguindo as instruções do fabricante.

A amplificação das amostras para detecção de *M. bovis* e *M. tuberculosis* seguiu a metodologia de Flamínio (2019) onde todas as reações de qPCR foram realizadas em um equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* com o *7500 Software v.2.3* (Applied

Biosystems). Para as ampliações utilizou-se o sistema: *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA). As concentrações e temperatura foram definidas conforme as instruções do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as contagens de microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária, *Staphylococcus* coagulase positiva, *E. coli* e *Pseudomonas* spp. apresentaram as maiores contagens (Tabela 1). *Coxiella burnetti* e *L. monocytogenes* foram identificados em 7,84% e 1,96% das amostras, respectivamente. Não foram detectados *Salmonella* spp., *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Tabela 1).

Tabela 1: Contagens médias (Log) de microrganismos indicadores de qualidade-higiênico sanitária e presença de patógenos em amostras de queijos frescos não inspecionados (n=51) comercializados informalmente na região de Botucatu, SP.

Microrganismo	Média	Mínimo	Máximo	DP	Parâmetros adotados
Log UFC/g					
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2,79	-0,18	7,01	2,39	3,00 ⁽¹⁾
<i>E. coli</i>	2,59	0,00	5,60	1,74	3,00 ⁽¹⁾
<i>B. cereus</i>	0,14	0,00	3,96	0,72	2,7 ⁽²⁾
<i>Pseudomonas</i> ssp.	2,18	0,00	7,64	2,98	6,34 ⁽³⁾
Presença ou ausência em 25 g					
<i>L. monocytogenes</i>	1/51 (1,96%)				Ausência* ⁽¹⁾
<i>Salmonella</i> ssp.	0/51 (0,00%)				Ausência ⁽¹⁾
Detecção molecular em 10 g					
<i>Mycobacterium bovis</i>	0/51 (0,00%)				Ausência
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0/51 (0,00%)				Ausência
<i>Coxiella burnetii</i>	4/51 (7,84%)				Ausência

⁽¹⁾ IN 161 (ANVISA, 2022) para queijos de umidade $\geq 46\%$.

⁽²⁾ IN 161 (ANVISA, 2022) para *Bacillus cereus* em sobremesas lácteas.

⁽³⁾ Champagne et al. (1994).

* Ausência em 25g.

Na figura 1 são apresentados os resultados obtidos neste estudo, os quais foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela IN nº 161 de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para queijos de umidade $\geq 46\%$.

Para os limites de *Bacillus cereus* foram utilizados os parâmetros descritos para sobremesa láctea (BRASIL, 2022). Para *Pseudomonas* spp. foi utilizado o estudo de Champagne et al. (1994), pois não dispõe de parâmetros oficiais para qualquer categoria de alimento.

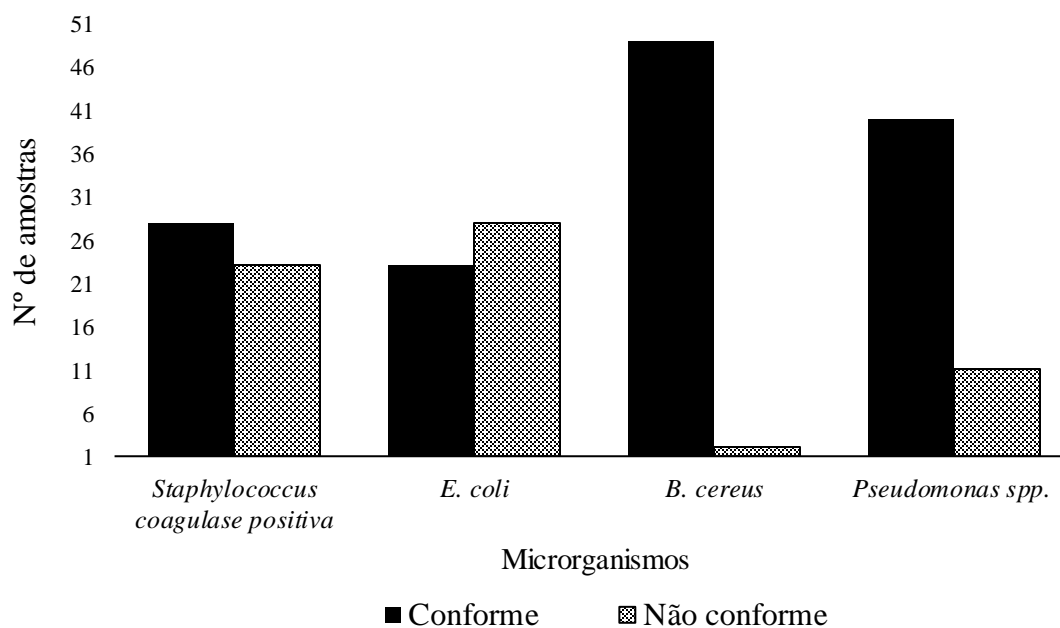


Figura 1: Número de amostras conforme e não conforme de acordo padrões legais da IN nº 161 (BRASIL, 2022) e Champagne et al. (1994).

De todos os queijos analisados apenas quatro (7,84%) amostras apresentaram conformidade com todos os parâmetros adotados, sendo todos provenientes de propriedades rurais. Das demais amostras, 26 (50,98%) apresentaram não conformidade em ao menos um parâmetro avaliado, 20 (39,21%) em dois parâmetros e uma (1,96%) amostra em três parâmetros.

A presença de *L. monocytogenes* em uma das amostras (1,96%) proveniente de estabelecimento comercial demonstra a não conformidade do produto que está sendo disponibilizado para consumo da população e o conseqüente risco à saúde do consumidor. Vinha et al. (2016) encontraram *L. monocytogenes* em 1 (1,96%) amostra dos 77 queijos

analisados em seu estudo, enquanto Apolinário et al. (2014) detectaram 9,6% dos queijos de seu trabalho contaminados com o microrganismo.

Em nosso estudo o isolado de *L. monocytogenes* foi caracterizado no sorogrupo IV (4b), além disso, esse isolado abrigava genes relacionados a virulência, como o fator de internalização celular e disseminação célula a célula (*inlA*, *inlB*, *inlC*), síntese de listeriolisina (*hlyA*) e polimerização de actina (*actA*) no hospedeiro, evidenciando a importância epidemiológica relacionada a esse microrganismo. Bem como, o isolado apresentava genes relacionados a formação de biofilme e adaptações a condições estressantes (*prfA*, *agrBCDA*). Tais genes quando expressos pela bactéria auxiliam na internalização de *L. monocytogenes* (*inlA*, *inlB*) na parede celular do hospedeiro, na propagação para outras células adjacentes (*inlC* e *actA*), produção de listeriolisina para manutenção do patógeno na célula hospedeira assim como sua multiplicação (*hlyA*) e resistência ambiental (*prfA*, *agrBCDA*) frente a adversidades do ambiente (LIU et al., 2007, PAZIAK-DOMANSKA et al., 1999; SUAREZ et al., 2001).

O sorotipo 4b é o menos prevalente na contaminação de alimentos, entretanto é comumente relacionado a ocorrência da forma invasiva de listeriose apresentando altas taxas de mortalidade quando indivíduos de grupos de risco são acometidos (BARANCELLI et al., 2011).

Por mais que não tenha sido analisado a capacidade fenotípica de adesão e formação de biofilmes, nosso isolado apresentou genes importantes relacionados a essas características, evidenciando um fator para a contaminação cruzada e persistência no ambiente assim como associação com a forma invasiva de listeriose (FABER e PETERKIN, 1991; MEAD et al., 2000).

A detecção de *C. burnetii* (n=4; 7,84%) foi um achado importante, pois se trata de um agente zoonótico e sua presença em leite e derivados lácteos não é frequente (Gale

et al., 2015). Nossos achados corroboram com os encontrados por Rozental et al. (2020) e Mioni et al. (2019) onde ambos detectaram 9,43% e 3,57% de prevalência em queijos maturados e leite cru respectivamente, demonstrando a importância de tais alimentos como potencial fonte de infecção para humanos. Apesar da principal via de transmissão de *C. burnetii* ocorrer pela inalação de aerossóis contaminados, surtos de febre Q por ingestão de leite cru e queijo contaminados já foram descritos sugerindo que o risco do consumo de produtos lácteos contaminados não pasteurizados não deve ser negligenciado (GALE et al., 2015; SIGNS et al., 2011).

A detecção de *C. burnetii* nos queijos analisados em nosso estudo demonstra a existência de rebanhos contaminados na região amostrada e, por se tratar de um patógeno transmitido também pelo ar que pode se disseminar por longas distâncias carregado pelo vento, há a possibilidade de ocorrência de surtos de febre Q nas cidades próximas as propriedades infectadas constituindo potencial risco para a saúde pública (MIONI et al., 2020; TISSOT-DUPONT et al., 2004).

Apenas duas (3,92%) amostras estavam fora dos limites estabelecidos para *B. cereus*, com contagens de 3,96 e 3,34 logs UFC/g ambas provenientes de estabelecimentos comerciais (Tabela 1 e Figura 1). A contagem de *B. cereus* observada neste estudo foi menor que o limite mínimo descrito pela literatura científica capaz de causar doença clínica e efeitos deletérios na degradação do alimento (DOYLE e BUCHANAN, 2013; FORSYTHE, 2013; ARNESEN et al., 2008). No entanto, a baixa contagem de *B. cereus* nos queijos analisados não diminui o potencial risco do consumo deste produto, visto que o mesmo não é um alimento de consumo rápido podendo ficar vários dias estocado na geladeira das residências e devido sua característica psicrotrófica, pode multiplicar-se nesse ambiente. A ausência de parâmetros legais para contagem de *B. cereus* em queijos é preocupante, visto que não apenas em nosso trabalho foi possível

isolar o microrganismo, Kabuki et al. (2008) encontraram contagens de 10^3 a 10^5 UFC/g de *B. cereus* em queijos provenientes do comércio da cidade de Campinas/SP, sendo que 22% desses queijos apresentavam contagens superiores a 10^5 UFC/g, considerada a dose infectante e potencialmente enterotoxigênica.

Com relação a *Staphylococcus* coagulase positiva foram observadas contagens variando entre -0,18 a 7,01 log UFC/g, sendo que 23 amostras (38%) estavam em desacordo com o permitido para queijos pela legislação brasileira (Tabela 1 e Figura 1). A elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de queijo pode sugerir falhas de higiene no processo de produção do mesmo, ou ainda má qualidade sanitária da matéria prima (KAMIMURA et al., 2020). No entanto, não é possível distinguir a fonte de contaminação devido ao fato da matéria prima não ser pasteurizada o que poderia direcionar a causa do problema caso o foco de contaminação fosse mastite bovina. Melo et al. (2013) reiteraram que altas populações de *Staphylococcus* spp. têm potencial inibitório contra bactérias mais sensíveis frente a competição pela microbiota, o que também pode justificar a alta contagem dessas bactérias nas amostras analisadas.

Alimentos com contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^5 UFC/g podem apresentar potencial produção de enterotoxinas e causarem intoxicações (NIA et al., 2016). Em nosso trabalho foi observado que 13 amostras (25,49%) apresentavam contagens de *S. coagulase* positiva acima desse valor constituindo um potencial risco para a produção de enterotoxinas (NIA et al, 2016). Entretanto, devido a sua característica termo resistente, as enterotoxinas estafilocócicas podem estar presentes mesmo quando *S. coagulase* positiva não esteja mais viável no alimento ou até mesmo quando a contaminação do alimento se dá por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, visto que também apresentam potencial produção de enterotoxinas além de serem mais prevalentes nos casos de mastite em vacas (GUIMARÃES et al., 2013; LE

LOIR et al., 2003). As enterotoxinas estafilocócicas mais relacionadas a ocorrências de intoxicações são SEA, SEB, SEC, SED e SEE, contudo em nosso estudo não foi possível realizar a avaliação da presença/quantificação das mesmas, devido a limitações metodológicas (BLAIOTTA et al., 2004).

Para *E. coli* foram observadas 28 (54,9%) amostras fora do padrão estabelecido pela a IN nº 161 (BRASIL, 2022), com contagens variando entre 0,0 a 5,6 log UFC/g (Tabela 1 e Figura 1). A presença de altas contagens de *E. coli* entre as amostras independente aos locais de coleta pode indicar uma possível contaminação de origem fecal e conseqüente má qualidade higiênico-sanitária na produção dos queijos. Outra questão relevante para tal resultado é o fato de que muitos produtores/comerciantes não dispõe de local adequado para a produção, armazenamento e comercialização dos produtos (VINHA et al., 2016). *E. coli* patogênicas são um dos principais microrganismos envolvidos em DOA, contudo, muitas estirpes de *E. coli* habitam de forma comensal o intestino de homens e de animais, sendo que o isolamento do agente pode não distinguir estirpes comensais de patogênicas; portanto não pode ser relacionado necessariamente com a ocorrência de DOA (RAMOS et al., 2020).

As contagens de *Pseudomonas* spp. variaram de 0,0 a 7,64 log UFC/g, apresentando média de contagens de 2,18 log UFC/g, sendo oriundas dos três tipos de locais avaliados. A literatura sobre a contaminação de queijos por *Pseudomonas aeruginosa* é escassa e conflitante, apresentando estudos onde não se detectaram a presença da bactéria, enquanto outros obtiveram êxito em isolá-la (CARVALHO et al., 2009; OKUNO et al., 2021). Somado a este fato, observa-se a ausência de parâmetros legais para contagem de *Pseudomonas* spp. no Brasil, o que dificulta a determinação de referências para sua avaliação. Os resultados da análise deste agente deteriorante em nosso estudo foram baseados nos relatos de Champagne et al. (1994) que descreveram contagens de

Pseudomonas spp. acima de 6 log UFC/g como capazes de produzir proteases e lipases a ponto da deterioração do alimento ser percebida e indesejada pelo consumidor. Acredita-se que o impacto de *Pseudomonas* spp. na saúde humana esteja subestimado, pois o microrganismo tem sido relacionado a ocorrência de surtos de origem alimentar mesmo em baixa prevalência, apresentando potencial resistência a multidrogas (CAPODIFOGGIO et al., 2016; DE PAULA et al., 2021; QUINTIERI et al., 2019). Como se trata de um agente oportunista a nível de interesse em saúde humana, seria importante a determinação da dose infectante capaz de manifestar sintomas clínicos visto que ainda não foi definida.

Entre as amostras analisadas não foi observada contaminação por *Salmonella* spp. demonstrando concordância com a legislação brasileira, onde o patógeno deve estar ausente em 25 g de amostra de queijos com umidade $\geq 46\%$. Segundo Apolinário et al. (2014) a associação entre bactérias ácido lácticas (BAL) e coliformes promove a acidificação do meio inibindo, consequentemente outras bactérias que não são resistentes ao pH ácido do meio, como por exemplo *Salmonella* spp. Nosso trabalho corrobora com os estudos de Amaral et al. (2020) e Silva et al. (2015a) que também não isolaram *Salmonella* spp. nos queijos analisados em suas pesquisas.

A ausência de detecção de *M. bovis* e *M. tuberculosis* nas amostras deste estudo não isenta que o consumo destes produtos não apresente perigos para o consumidor, pois a falta de pasteurização do leite é um fator de risco alto para a persistência de tais patógenos assim como para *C. burnetii*. Contradizendo nossos achados Cezar et al. (2016) e Harris et al. (2007) isolaram o patógeno na matriz de queijos frescos e de coalho, podendo assim demonstrar o risco inerente ao consumo do alimento produzido com leite não pasteurizado e proveniente de rebanho sem controle sanitário para tal doença.

O número de queijos em não conformidade para *S. coagulase* positiva, *Pseudomonas* spp. e *B. cereus* foi menor em comparação com os queijos que atenderam os parâmetros microbiológicos oficiais, o que não significa que o produto esteja apto ao consumo, dado que altas porcentagens das amostras se encontraram acima dos limites microbiológicos estabelecidos oferecendo risco a saúde pública. Somado a isso, as altas contagens de *E. coli* e a presença de *L. monocytogenes* e *C. burnetii* denotam potencial ameaça à saúde pública. Além disso, as duas amostras de *B. cereus* apresentaram elevadas contagens quando comparado com os parâmetros para outros derivados lácteos presentes na legislação regulamentadora (BRASIL, 2022).

As altas contagens de *S. coagulase* positiva e *E. coli* demonstram má qualidade higiênico-sanitária seja ela proveniente da falta de boas práticas de produção agropecuárias, má higienização dos equipamentos do processo de ordenha, além da sanidade animal, ou ainda, falta de boas práticas de manipulação na produção do queijo e seu incorreto armazenamento. A presença de *B. cereus* pode indicar contaminação cruzada e provável ausência de boas práticas de fabricação, enquanto a presença de *L. monocytogenes* sugere falhas no processo de produção desses queijos.

Esses resultados são preocupantes, pois o fato do queijo fresco informal ter um custo mais baixo em comparação com o produto industrializado constitui um fator muitas vezes decisivo para a compra do alimento e, somado a escassez de informações acerca dos riscos do consumo desse tipo de produto, coloca a saúde da população em vulnerabilidade. Segundo observado no estudo de Amorim et al. (2014), o valor médio de compra dos queijos informais pode ser um fator importante para a decisão de compra pelo consumidor associado a falta de conhecimento das diferenças entre os produtos formais e informais aliado a preferência pelo sabor do queijo informal relatado pelos entrevistados no referido estudo.

A ausência de programas de autocontrole no processo de fabricação artesanal assim como falta de treinamento em boas práticas de manipulação e armazenamento aliados a fiscalização sanitária deficiente e o livre comércio de alimentos informais em todo o país constitui um risco para a saúde pública, pois não somente expõe a população a ocorrência de surtos de DOA como dificulta a identificação, rastreamento e recolhimento desses produtos pelo fabricante para evitar o surgimento de novos surtos. Um exemplo da importância de todos esses fatores associados a uma boa colaboração entre os órgãos oficiais e a indústria pode ser exemplificado pelo trabalho de Nüesch-Inderbinen et al. (2021) que descreveu um surto de listeriose ocorrido na Suíça em 2020 onde foi possível identificar, pela própria indústria através de análises de rotina, a contaminação de queijos do tipo *Brie* e correlacionar o ocorrido com o surgimento de casos de DOA. Neste mesmo estudo fica explícita a agilidade do serviço de saúde pública da Suíça o qual realizou o rastreamento e a apreensão dos produtos fabricados pela empresa que ainda estavam disponíveis no varejo, evitando assim novas infecções por *L. monocytogenes*.

CONCLUSÃO

O alto número de amostras em desconformidade com os padrões da legislação para os microrganismos pesquisados neste estudo evidencia a má qualidade sanitária do queijo fresco não inspecionado comercializado informalmente na região de Botucatu/SP, dado este preocupante para a saúde pública, o que reforça a necessidade de ações mais incisivas de fiscalização sanitária para coibir a venda deste produto a fim de evitar possíveis ocorrências de surtos de doenças veiculadas por esse tipo de alimento.

APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. W. et al. Avaliação da qualidade de queijos de produção informal. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, n. 61, p. e020016, 2020.
- AMORIM, A. L. B. DO C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, 2014.
- APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- ARGUDÍN, M. Á. Et al. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751–1773, 2010.
- BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 816–819, 2011b.
- BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 719–730, 2004.
- BRANT, L. M. F. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.
- BRASIL (2022) Ministério da Saúde. ANVISA. **Instrução Normativa nº 161**, de 01 de julho de 2022. Brasília. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>> Acesso em: 02 set. 2022.
- BRASIL (2019) Ministério da Saúde. ANVISA. **RDC nº 331**, de 23 de dezembro de 2019. Brasília. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>> Acesso em: 02 set. 2022.
- BRASIL. **Guia de negócio queijos artesanais**. Brasília, DF. 2021. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1135036/1/Guia-de->

- Negocio-Queijos-Artesanais.pdf>. Acesso em: 28/04/2022.
- CAMARGO, A. C. et al. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393–409, 2021.
- CAPODIFOGGIO, E. et al. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5214–5223, 2016.
- CARVALHO, P. L. N. et al. Research about *Listeria* Sp., *Salmonella* Sp. and others contamination indicators to milk's and cheese's samples sale in the south of minas gerais state. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 4422–4431, 2009.
- CEZAR, R. D. S. et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 5, n. 3, p. 269–272, 2016.
- CHAMPAGNE, C.P. et al. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.**, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994.
- DA SILVA, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados no sudoeste do paraná. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 33–44, 2015.
- DE BUYSER, M. L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1–2, p. 1–17, 2001.
- DE FREITAS GUIMARÃES, F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866–2872, 2013.
- DE PAULA, A. C. L. et al. Microbiome of industrialized Minas Frescal Cheese reveals high prevalence of putative bacteria: A concern in the One Health context. **Lwt**, v. 139, n. September 2020, 2021.
- DOUMITH, M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3819-3822, 2004.
- FLAMÍNIO, A. P. *Padroniza o e valida o da técnica de PCR em tempo real para detec o de Mycobacterium bovis e Mycobacterium tuberculosis em linfonodos de bovinos*. 2019. 131f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- HOOVER, T. A. et al. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. **J Bacteriol.**, v. 174, p. 5540-5548, 1992.
- ISO. 2017. ISO 11290-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2017. ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2004. ISO 7932 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Bacillus cereus*.: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2001. ISO 16649 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Escherichia coli*.: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2003. ISO 6888-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of positive coagulase *Staphylococcus*.: Detection method. Geneva: ISO.
- ISO. 2010. ISO 13720 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Pseudomonas* sp.: Detection method. Geneva: ISO.
- DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 4^o ed. Washington: ASM Press, 2013. 1118p.
- FABER, J.M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, 1991.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2^o ed., Porto Alegre: editora Artmed, 2013. 607p.
- GALE, P. et al. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1083–1095, 2015.
- HARRIS, N. B. et al. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 1025–1028, 2007.
- HONISH, L. et al. An Outbreak of *E. coli* O157:H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. **Revue Canadienne de Sante Publique**, v. 96, n. 3, p. 182–184, 2004.
- IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo agropecuário**, v. 8, n. 0103–6157, p. 1–105, 2019.
- KABUKI, D. Y. et al. *Bacillus cereus* potencialmente enterotoxigênico em queijos minas

- frescal produzidos por diferentes processos tecnológicos. **Sínteses: Revista Eletrônica do SIMTEC**, v. 0, n. 2, p. 140–140, 2008.
- KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 0, 2019.
- LE LOIR, Y. et al. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63–76, 2003.
- LIU, D. Y.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH, A. J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 133-140, 2007.
- MAKINO, S. I. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 189–196, 2005.
- MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Journal of Environmental Health**, v. 62, n. 7, p. 9–18, 2000.
- MELO, F. D. et al. Evaluation of the Safety and Quality of Microbiological Handmade Cheese Serrano and its Relation to Physical and Chemical Variables the Period of Maturity. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, 2013.
- MIONI, M. S. R. et al. Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. **Zoonoses Public Health**, v. 66, p. 695–700, 2019.
- MIONI, M. S. R. et al. *Coxiella burnetii* in slaughterhouses in Brazil: A public health concern. **Plos One**, v. 15, n. 10, p. 1-14, 2020.
- NIA, Y. et al. Review over a 3-year period of European Union proficiency tests for detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices. **Toxins**, v. 8, n. 4, 2016.
- NÜESCH-INDERBINEN, M. et al. Listeriosis Caused by Persistence of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Sequence Type 6 in Cheese Production Environment. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 01, 2021.
- OKUNO, N. T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas* spp. isolated from fresh Minas cheeses in Rio de Janeiro. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, v. 08, n. 1, p. 12–27, 2021.
- PACHECO, R. C. et al. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. **Emerg Infect Dis.**, v. 19, p. 344-346, 2013.
- PAZIAK-DOMANSKA, B. et al. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria*

- monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 209-214, 1999.
- QUINTIERI, L. et al. Antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. **Foods**, v. 8, n. 9, p. 1–32, 2019.
- ROZENTAL, T. et al. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 208–212, 2020.
- SIGNS, K. A. et al. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan. **Clin Infect Dis**, v. 55, p. 1387-1389, 2012.
- STENFORS ARNESEN, L. P. et al. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 579–606, 2008.
- SUAREZ, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. The bacterial actin nucleator protein actA is involved in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 853-864, 2001.
- SUZUKI, Y. et al. A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. **Food Microbiology**, v. 92, n. June, p. 103588, 2020.
- TISSOT-DUPONT, H. et al. Wind in November, Q fever in December. **Emerg Infect Dis.**, v. 10, n. 7, p.1264-1269, 2004.
- VAIDYA, V. M. et al. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 33, p. 307-321, 2010.
- VINHA, M. B. et al. Qualidade de queijos minas frescal produzidos e comercializados informalmente em agroindústrias familiares. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 6, n. 4, 2016.
- WHO. *Third meeting of the Foodborne Burden Disease Epidemiology Reference Group (FERG2) 2021-2024*. May, 2022, Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/04/26/default-calendar/third-meeting-of-the-foodborne-disease-epidemiology-reference-group-\(ferg2\)-2021-2024](https://www.who.int/news-room/events/detail/2022/04/26/default-calendar/third-meeting-of-the-foodborne-disease-epidemiology-reference-group-(ferg2)-2021-2024)>. Acesso em: 28/05/2022.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento e confirmação molecular de *L. monocytogenes* é um importante achado nos queijos analisados em nosso estudo visto que foi possível demonstrar através da cultura a viabilidade do agente para uma possível infecção em decorrência do consumo de queijo proveniente de produção e comércio informal. Somado a este fato permanece uma lacuna a ser preenchida em relação a ocorrência de surtos de listeriose no Brasil, evidenciando talvez um subdiagnóstico e/ou subnotificação de casos.

Apesar da detecção de *C. burnetii* em nosso estudo, não foi possível analisar a viabilidade do patógeno, pois para tal seria necessário realizar o cultivo microbiológico de agente em conjunto com a análise molecular, o que é um obstáculo frente a exigência de um alto nível de biossegurança (Laboratório NB 3), impossibilitando a execução da técnica em diversos laboratórios de pesquisa do Brasil (Ministério da Saúde, 2017).

No Brasil não há obrigatoriedade da vacinação contra *C. burnetii* nem programas voltados ao controle da doença nos animais de produção assim como ocorre com outras zoonoses tais como Brucelose e Tuberculose. Somado a este fato acrescenta-se a carência de um serviço de vigilância sanitária mais eficiente na detecção da ocorrência de casos da doença em nosso país.

Políticas públicas a fim de ampliar a divulgação de informações acerca da segurança sanitária dos alimentos se fazem necessárias uma vez que grande parte da população desconhece os riscos inerentes ao consumo de produtos informais que não sofrem fiscalização para garantir sua qualidade microbiológica. Pelo desconhecimento da importância da inocuidade dos alimentos, os consumidores acabam por optar pelo produto proveniente do comércio informal visto que normalmente o valor é mais atrativo que o produto formal; entretanto enquanto houver demanda por produtos informais dificilmente os produtores procurarão se aprimorar tecnicamente e atender as exigências sanitárias legais, pois isso exige investimento em infraestrutura assim como treinamento em boas práticas de fabricação.

Em suma, a pesquisa de microrganismos indicadores higiênico-sanitários e patogênicos nos queijos frescos produzidos sem inspeção sanitária e comercializados informalmente na região de Botucatu-SP demonstrou a ocorrência de bactérias com potencial ocorrência de surtos de DOA e zoonoses. A importância de estudos como este se justifica uma vez que se conhecendo a real situação epidemiológica desses agentes é

possível traçar políticas de saúde pública mais assertivas para a prevenção e controle da ocorrência de surtos de DOA.