



CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

SUELY CRISTINA PEREIRA DE LIMA OLIVEIRA

**RASTREABILIDADE DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO
PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL**

PATOS-PB

2016

SUELY CRISTINA PEREIRA DE LIMA OLIVEIRA

**RASTREABILIDADE DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO
PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Prof. Dr^a. Maria das Graças Xavier de Carvalho

Patos-PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

- O48r Oliveira, Suely Cristina Pereira de Lima
 Rastreabilidade das condições higiênico-sanitárias do processo de
 fabricação do queijo de coalho artesanal / Suely Cristina Pereira de Lima
 Oliveira. – Patos, 2016.
 68f. : il.
- Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de
 Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.
- "Orientação: Profa. Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho"
- Referências.
1. Controle de qualidade. 2. Derivado lácteo. 3. Lista de verificação.
 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Coagulase. 6. PCR. 7. Sequenciamento.
 I. Título.

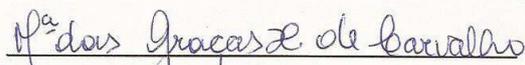
CDU 636.033

**RASTREABILIDADE DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO
PROCESSO DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL**

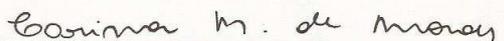
SUELY CRISTINA PEREIRA DE LIMA OLIVEIRA

Aprovada em 31/05/2016.

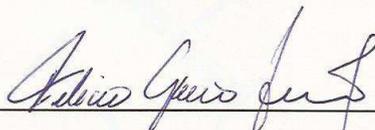
BANCA EXAMINADORA



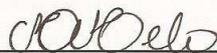
Prof.ª Dra. Maria das Graças Xavier de Carvalho
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB
(Orientadora)



Prof.ª Dra. Carina Martins de Moraes
Faculdade de Medicina Veterinária/UFPA – Castanhal/PA



Prof. Dr. Felício Garino Junior
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB



Prof.ª Dra. Marcia Almeida de Melo
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG – Patos/PB



Prof.ª Dra. Rita de Cássia Ramos de Egypto Queiroga
Departamento de Nutrição/CCS/UFPB – João Pessoa/PB

PATOS

2016

*Ao meu esposo Alan e a nossas filhas
Beatriz e Bruna, pelo incentivo e compreensão
nos momentos de ausência.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e por me proporcionar muito mais do que eu planejei para minha vida profissional.

À minha orientadora, professora Graça Xavier, não só pela orientação, mas também pela amizade, apoio, incentivo e ensinamentos valiosos ao longo desses mais de 15 anos de parceria. Muito obrigada por confiar em mim e no meu trabalho.

À professora Márcia Melo e seu esposo professor Paulo Andrade, pela co-orientação e pelos sábios ensinamentos.

Ao meu esposo Alan, pelo seu Amor, carinho, paciência e amizade dia a dia. Sem seu apoio seria muito difícil essa caminhada.

As minhas filhas Beatriz e Bruna, pelo carinho, amor e, principalmente, por compreender todos os momentos que não pude estar presente.

Aos meus pais, Edmundo e Fátima, e minha irmã Renata, mesmo distante, sempre me incentivaram e torceram por essa vitória.

A todos os meus amigos da universidade e dos laboratórios de Leite e Biomol. Especialmente: Dalana Régia (pela ajuda inicial), Amanda Chagas (companheira nas coletas e análises microbiológicas), Samara Jacielma e Maira Porto (amigas-irmãs sempre a postos), Vivianne Cambuí (meu anjo e braço direito) e Rosália Medeiros (pelos ensinamentos iniciais).

A todos os membros da banca examinadora, por contribuírem com este trabalho.

Aos proprietários das queijarias, por nos receberem durante os meses de coleta e confiarem na nossa contribuição para a sociedade.

Ao SEBRAE e ao colega Lhano Nishio, pelo apoio, confiança e parceria.

Ao IFPB, por permitir o afastamento para a realização do curso.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Esta tese é composta por três artigos, que estão divididos em capítulos. No primeiro capítulo foi abordado as condições gerais e adequações quanto às Boas Práticas de Fabricação (BPF) de oito queijarias artesanais de queijo de coalho, com o principal objetivo de investigar as conformidades e não conformidades relativas a sua implementação. Para tanto, usou-se como critério avaliativo um checklist baseado na Resolução – RDC nº 275 da ANVISA/MS, onde os resultados mostraram que das oito queijarias, apenas uma classificou-se como de baixo risco, ou seja, com mais de 76% de adequações. As principais não conformidades foram: instalações, controle de pragas e da água, higiene dos manipuladores, ausência de tratamento térmico da matéria prima e documentação. O segundo capítulo relata os principais pontos de contaminação do queijo de coalho em queijarias artesanais do Sertão paraibano, avaliando a qualidade higiênica do processamento através da quantificação de coliformes, mesófilos, *Escherichia coli* e identificação de *Staphylococcus* spp. Em amostras de leite, queijos, swabs do tanque de fabricação, mesa, fôrma e mãos dos manipuladores, além da água utilizada na fabricação e limpeza dos equipamentos, onde os resultados demonstraram que o leite cru de todas as queijarias apresentaram alta contaminação microbiológica, estando em desacordo com a IN 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A superfície da mesa, tanque, fôrma e mãos dos manipuladores também apresentaram altas contagens para todos os micro-organismos. No queijo detectou-se coliformes a 30° C, termotolerantes e *E. coli*. As contagens de *Staphylococcus* spp. apresentaram acima de $1,3 \times 10^5$ UFC/g, podendo favorecer a produção de enterotoxinas sob condições adequadas e os principais agentes isolados nas amostras foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*. O leite apresentou *S. aureus* em todas as queijarias, porém, no queijo houve predomínio de espécies coagulase negativa, sendo também encontradas nos utensílios e mãos dos manipuladores. O terceiro capítulo aborda a identificação dos genes *FemA*, *Coa* com sequenciamento das amostras positivas para esse gene e de enterotoxinas clássicas nas 51 cepas de *Staphylococcus* spp isoladas a partir de amostras de leite, queijo de coalho e utensílios obtidas em três queijarias artesanais. De acordo com a identificação das espécies, das 51 cepas obtidas, 16 foram identificadas como *S. aureus*, porém, todas as amostras de *Staphylococcus* spp. foram submetidas a técnica de PCR para presença do gene *femA* e *coa*, onde houve amplificação do gene *femA* em 40 amostras e apenas 20 amostras, cujos tamanhos variaram de aproximadamente 500 a 900 pb. Na pesquisa das enterotoxinas, nenhum dos isolados analisados possuía os genes *sec* e *see*. Houve apenas a amplificação para o gene *sea* e *seb* em uma mesma amostra e *sed* em outra. As amostras positivas para o gene *Coa* foram submetidas ao Blast e exibiram grande homologia com sequencias codificadoras do gene da estafiloagulase de *S. aureus* depositadas no NCBI. Foi construída uma árvore filogenética baseada nas sequencias, onde foi apresentada a relação entre as amostras. As cepas oriundas do

leite, queijo, mãos dos manipuladores da queijaria A apresentaram bastante similaridade, sugerindo que o leite cru e as mãos contribuíram para a contaminação do queijo. O mesmo ocorreu com as amostras das mãos e tanque da queijaria C. Este estudo mostrou que a identificação genotípica de *Staphylococcus* spp. pode ser feita pela amplificação do gene *femA* e do gene *Coa*, com apresentação de grande polimorfismo genético. A identificação do gene para enterotoxinas mostrou-se útil para avaliar um possível perfil dos *S. aureus* e o sequenciamento confirmou os pontos de contaminação bacteriana no processamento de fabricação do queijo de coalho.

Palavras chaves: Controle de qualidade; Derivado Lácteo; Lista de verificação; *Staphylococcus aureus*; Coagulase; PCR; Sequenciamento.

ABSTRACT

This thesis is composed by three articles which are divided into chapters. On the first chapter, it was discussed the general conditions and adequacies regarding the Good Manufacturing Practices (GMP) of eight artisanal curdled cheese factories and which the main objective was to investigate the conformities and non-conformities related to its implementation. Therefore, it was used, as evaluation criteria, a checklist based on the resolution – RDC number 275 of ANVISA/MS, and the results showed that from the eight evaluated cheese factories, only one was classified as low risk, that is with more than 76% of adequacies. The main non-conformities were: facilities, water and plague control, handlers' hygiene, lack of thermal treatment of raw material and documents. The second chapter reports the main contamination spots of curdled cheese in artisanal cheese factories in the sertão of Paraíba, evaluating the hygienic quality of processing through the quantification of coliforms, mesophilic, *Escherichia coli* and identification of *Staphylococcus* spp. In milk samples, cheese, swabs from the fabrication tank, table, mold and handlers' hands, and also on water used in the fabrication and cleaning of the equipment, the results showed that the raw milk from all the cheese factories was highly contaminated with microorganisms, therefore being in discordance with the Normative Instruction (IN) 62 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. The surface of the table, mold and handlers' hands also showed high rate of all microorganisms. On the cheese, it was detected thermotolerant coliforms at 30° C as well as *E. coli*. The counts for *Staphylococcus* spp. showed more than $1,3 \times 10^5$ UFC/g, which favors the production of enterotoxins under adequate conditions and the main isolated agents on the samples were *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*. The milk indicated *S. aureus* in all cheese factories. However, on the cheese there was a predominance of coagulase-negative specimens, which were also found in utensils and handlers' hands. The third chapter discusses the identification of *FemA*, *Coa* genes, with sequencing of positive samples for this gene as well as the classical enterotoxins on the 51 strains of *Staphylococcus* spp isolated from milk samples, curdled cheese and utensils from three artisanal cheese factories. According to the identification of the specimens, of the 51 obtained strains, 16 were identified as *S. aureus*. However, all *Staphylococcus* spp. samples were submitted to PCR technique to detect the presence of *femA* and *coa* gene, where there was amplification of the *femA* gene in 40 samples and only in 20 samples the size varied from approximately 500 to 900 pb. In the research of the enterotoxins, none of the analyzed which were isolated had the *sec* and *see* genes. There was only the amplification for the *sea* and *seb* gene on the same sample and for the *sed* gene in another. The samples which were positive for the *Coa* gene were submitted to Blast and showed great equivalence with coding sequences of the Staphylococci coagulase of *S. aureus* stored in NCBI. A phylogenetic tree was built based on the sequences which presented relation with

samples. The strains originated from milk, cheese, handlers' hands showed great similarity, suggesting that the raw milk and the hands contributed for the cheese contamination. The same situation occurred with the samples from hands and from tank of cheese factory C. This study showed that the genotypic identification of *Staphylococcus* spp. can be done by the amplification of *femA* and *Coa* genes, with abundant genetic polymorphism. The identification of the gene for enterotoxins resulted to be useful to evaluate a possible *S. aureus* profile and the sequencing confirmed the bacterial contamination spots in the processing of curdled cheese fabrication.

Key-words: Quality control; Derived milk; Checklist; *Staphylococcus aureus*; Coagulase; PCR; Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo I.	
Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação de queijo de coalho	
Gráfico 1- Condições de conformidades e não conformidades quanto ao item edificação e instalações em queijarias artesanais, em 2014.	25
Gráfico 2- Condições de conformidades e não conformidades nas oito queijarias artesanais para o item equipamentos, móveis e utensílios, em 2014.	27
Gráfico 3- Análise de conformidades e não conformidades nas oito queijarias artesanais para o item higiene dos manipuladores, em 2014.	28
Gráfico 4- Análise de conformidades e não conformidades nas oito queijarias artesanais para o item produção e transporte do alimento, em 2014.	29
 Capítulo III.	
Identificação Molecular dos genes <i>FemA</i>, <i>Coa</i> e enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de queijarias artesanais	
Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene <i>femA</i> . Nota: M: Marcador de peso molecular (100pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 25923); CN: Controle Negativo; Canaletas 1-6: amostras positivas.	64
Figura 2- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da coagulase (<i>Coa</i>). Nota: M: Marcador de peso molecular (100pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 25923); CN: Controle Negativo; Canaletas 1-5, 8 e 9 Negativas; Caneletas 6, 7 e 10 com diferentes padrões de amplicons.	65
Figura 3- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da enterotoxina (<i>sea</i>). Nota: M: Marcador de peso molecular (100pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 14458); Canaleta 1: Positivo para o gene <i>sea</i> ; Caneleta 2: amostra negativa.	65

Figura 4: Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do gene da coagulase de 14 amostras de *S. aureus* isoladas de leite, queijo, swabs de mãos, tanque, mesa e fôrma de queijo de três queijarias artesanais da Paraíba, utilizando-se o método de neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo I.	
Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação de queijo de coalho	
Tabela 1 Índice de conformidades com sua respectiva classificação das queijarias de queijo coalho quanto ao nível de implantação das BPF, em 2014.	24
Capítulo II.	
Pontos de contaminação microbiológica em queijarias artesanais de queijo de coalho	
Tabela 1. Contagem média de aeróbios mesófilos e <i>Staphylococcus spp</i> em amostras de leite cru, queijo, mãos e utensílios na produção de queijo de coalho, em três queijarias no sertão paraibano, no ano de 2014.	39
Tabela 2. Perfil de espécies de <i>Staphylococcus</i> isolados do leite, queijo, mãos de manipuladores e utensílios utilizados na linha de produção do queijo de coalho, em três queijarias do sertão paraibano, em 2014.	41
Tabela 3. Média de Número Mais Provável de coliformes a 30° C, coliformes a 45° C e <i>Escherichia coli</i> em amostras de leite cru, queijo, mãos, utensílios e água na produção de queijo de coalho, em três queijarias no Sertão paraibano, no ano de 2014.	43
Capítulo III.	
Identificação Molecular dos genes <i>FemA</i>, <i>Coa</i> e enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de queijarias artesanais	
Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a amplificação de gene para espécies de <i>Staphylococcus</i> e detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.	64
Tabela 2: Resultados do alinhamento local das sequências do gene <i>Coa</i> de <i>S. aureus</i> . As sequências foram comparadas aquelas depositadas no National Center for Biotechnology Information, utilizando o Blast.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – por cento

µm - micrômetro

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI- Brain Heart Infusion

BPF – Boas Práticas de Fabricação

Coa- Gene da coagulase

DNA - *Desoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DTA- Doenças Transmitidas por Alimentos

Fem - Factor essential for methicillin resistance

g – grama

IN- Instrução normativa

KCl- Cloreto de Potássio

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM- Milimolar

MS – Ministério da Saúde

NCBI- National Center for Biotechnology Information

°C – graus Celsius

pb- Pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeira de Polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PPHO- Procedimento Padrão de Higiene Operacional

Primer- Oligonucleotídeo iniciador

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

sea – gene da enterotoxina A

seb – gene da enterotoxina B

sec – gene da enterotoxina C

sed – gene da enterotoxina D

see– gene da enterotoxina E

Tris-HCl- Aminometano-ácido clorídrico

U – Unidade

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UV-Ultra violeta

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Introdução	16
Referências	18
Capítulo I. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação de queijo de coalho	20
Resumo	21
Abstract	21
Introdução	22
Material e métodos	23
Resultados	24
Discussão	24
Conclusão	30
Referências	30
Capítulo II. Pontos de contaminação microbiológica em queijarias artesanais de queijo de coalho	34
Resumo	35
Abstract	35
Introdução	36
Material e Métodos	37
Resultados e Discussão	38
Conclusões	45
Referências	45
Capítulo III. Identificação Molecular dos genes <i>FemA</i>, <i>Coa</i> e enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de queijarias artesanais	49
Resumo	50
Abstract	50
Introdução	51

Material e Métodos	52
Resultados	55
Discussão	56
Conclusões	59
Referências Bibliográficas	60
Considerações Finais	68
Anexos . Normas das Revistas	69

INTRODUÇÃO

Uma das mais importantes atividades da fabricação de produtos lácteos em vários estados da Região Nordeste do Brasil, para os pequenos e médios produtores rurais, é a fabricação de queijo de coalho. Essa produção é comprovadamente incorporada à cultura regional de tradição secular, transferida através de gerações e que apresenta um amplo mercado consumidor e uma grande importância sócio-econômica, com expressiva participação na fonte de renda e geração de emprego local (CAVALCANTE et al., 2004; SEBRAE, 2008), sendo este considerado como um patrimônio da população nordestina, despertando o interesse dos agentes promotores do desenvolvimento, dos produtores, de instituições públicas e privadas e de gestores públicos (MENEZES, 2011).

A quantificação da produção artesanal não consta em estatísticas oficiais. No entanto, sabe-se da existência de numerosas unidades de produção caseira e de fazendas produtoras (NASSU et al, 2003). Esses mesmos autores relatam que a diversificação da manufatura do queijo de coalho pode ser constatada na produção de vários fabricantes, além do processamento desse queijo não estar bem definido, o que leva a falta de padronização.

O SEBRAE (Serviço Brasileiro de Assistência a Empresa) da Paraíba, em 2008 identificou em pesquisa que na região do Sertão da Paraíba o segmento das queijarias encontra-se em sua maior parte em completa informalidade (93,3%). O processo produtivo é fortemente artesanal em 67,8% dos estabelecimentos e neste universo, 76,7% delas não pasteurizam o leite. É importante frisar que, tendo passado todos esses anos, a situação continua praticamente a mesma, ou seja, muitas queijarias continuam na informalidade.

Muitas vezes a produção desses queijos artesanais é feita por pequenos pecuaristas, principalmente da zona rural nordestina, e representa importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar local. Essa produção artesanal em geral ocorre sob condições higiênico-sanitárias e estruturais precárias, sendo a qualidade do queijo produzido objeto de preocupação de autoridades sanitárias, podendo representar perigo à saúde do consumidor (CAVALCANTE, 2005).

A fabricação de queijo de coalho artesanal não conta com tecnologia apropriada para a melhoria de sua qualidade, nem tampouco qualquer padronização do processo de elaboração ou fiscalização pelos órgãos reguladores. O que se observa em parte da região Nordeste é que quando uma usina beneficiadora rejeita o leite de produtores, estes recorrem às queijarias artesanais para venderem sua produção, principalmente por grande parte desses estabelecimentos não realizar processo de tratamento térmico, bem como não ter um devido controle de qualidade do leite. Porém, cuidados são necessários para que este seja produzido e consumido dentro dos padrões de qualidade.

De acordo com a Instrução Normativa (IN) nº 30, de 26 de junho de 2001, o queijo de Coalho é um produto de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida, obtida por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação (BRASIL, 2001).

O leite e seus derivados podem abrigar uma variedade de micro-organismos, entre eles patógenos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) e a ocorrência dessas enfermidades deve-se às seguintes razões: consumo de leite *in natura*, consumo de queijos produzidos a partir de leite cru, não eliminação de toxinas de micro-organismos produzidas durante a pasteurização e contaminação do leite pós-pasteurização, pela presença de biofilmes em utensílios e equipamentos de laticínios (OLIVER et al., 2005).

Como forma de prevenir e/ou controlar a incidência de DTA's, medidas preventivas como a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) podem ser introduzidas nas linhas de processamento como meio de garantir a produção de alimentos seguros (OPAS/MS, 2008).

A presença de *Staphylococcus* é amplamente difundida na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios. Esses microrganismos podem ser encontrados nos pêlos, na pele, boca, narinas, glândulas mamárias, trato respiratório e intestinal (JAY, 2005). A espécie *S.aureus* assume destacada relevância em Saúde Pública, pois é comumente encontrada em leite e, principalmente, em queijos devido a falhas durante o processamento e comercialização, que podem favorecer a incorporação desses microrganismos (PERESI et al., 2001). As vias mais comuns de contaminação podem ser o próprio leite, o manipulador e o ambiente de fabricação (BORGES, 2006).

A espécie *S. aureus* é a mais relacionada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem enterotoxinas, principalmente quando presentes em elevadas concentrações do agente (10^5 - 10^6 UFC/ mL ou g) e sob condições adequadas de temperatura, pH, atividade de água e Oxigênio (ANDRADE et al., 2011).

As ferramentas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido muito importantes para diagnosticar a contaminação microbiana nas indústrias de alimentos, assim como caracterizar o potencial patogênico das cepas isoladas de alimentos e do ambiente de processamento. A amplificação do DNA pode demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas, antes da expressão das toxinas, com base nas sequências específicas dos genes e desta forma detectarem a fonte potencial de contaminação (HOLECKOVÁ et al., 2002).

Dentre as várias técnicas, a amplificação do gene *FemA* por PCR é uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* sendo, portanto, uma alternativa rápida e segura para identificação desta bactéria (ARCURI et al. 2004; LANGE et al. 2004;).

A tipagem do gene *Coa* também é uma ferramenta epidemiológica de fácil execução, específica e discriminatória, quando empregada na subtipagem de *S. aureus* isolados de fontes

humanas e animais (AARESTRUP et al., 1995). O seqüenciamento desse gene da coagulase ou de sua porção 3' terminal tem sido um recurso utilizado para o estudo comparativo e de filogenia entre isolados de *S. aureus* (WATANABE et al., 2005). A extremidade 3' desse gene possui uma região polimórfica constituída por unidades repetidas de 81 pb, e é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de seqüências repetidas (GOH et al., 1992).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a contaminação microbiológica da cadeia produtiva do queijo de coalho produzido artesanalmente na região do sertão paraibano. A tese está organizada em três capítulos. O capítulo I foi um levantamento das condições higiênico sanitárias de oito queijarias por meio de aplicação da lista de verificação ou *checklist*. O capítulo II descreve a identificação dos pontos de contaminação na produção de queijo de coalho, determinando a origem e as etapas passíveis de contaminação em queijarias artesanais. O capítulo III relata a identificação genotípica em amostras de *Staphylococcus* spp. pela detecção do gene *femA*, a confirmação pelo gene *Coa* nos *S. aureus*, além da pesquisa genes codificadores de enterotoxinas e monitoramento da qualidade do queijo de coalho por meio do sequenciamento dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru, utensílios, mãos de manipuladores e do produto final.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; DANGLER, C. A.; SORDILLO, L. M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 124-128, 1995.
- ANDRADE, A. P. C.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MACHADO, T. F.; PORTO, B. C. Perfil de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Negativa Contaminantes de Queijo de Coalho. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical**. 18 p. 2011.
- ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-3.
- BORGES, M. F. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. 2006. 221f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul.2001a, p.13-15.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; SILVA, R. F. N. Valorização do queijo de artesanal brasileiro: caso do queijo de coalho. **Revista Instituto Candido Tostes**, v.59, n.339, p.215-18. 2004.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

GOH, S.; BYRNE, S.K.; ZHANG, J.L. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1642-1645, 1992.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, H.; FOTTA, M.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, n. 9, p. 179-182, 2002.

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

LANGE, C.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F.; TAVARES, W.; CARVALHO, L. B.; MARICATO, E. Identificação de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite cru pela técnica de PCR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004. p. 1-4.

MENEZES, S. de S.M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de geografia (UFPE)**. v. 28, n. 1, p.40-56, 2011 Disponível em: <<http://www.ufpe.br/revistageografia/index.php/revista/article/viewFile/318/339>> Acesso em: 11 de julho de 2012.

NASSU, R.T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Embrapa, Fortaleza, CE, dezembro, 2003. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/425118/1/bd11.pdf>> Acesso em: 11 de julho de 2012.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OPAS/OMS, ORGANIZAÇÃO Pan – Americana da Saúde. Ministério da Saúde. Perspectiva sobre a análise de risco de risco na segurança dos alimentos. Curso de sensibilização. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças, 2008. 160p.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, p. 63-70, 2001.

SEBRAE/PB. Perfil Tecnológico das Queijeiras no Sertão da Paraíba. Pesquisa. SEBRAE, novembro de 2008. 58p.

WATANABE, S. et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**, v. 187, n.11, p. 3698-3707, 2005.

CAPÍTULO I

Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do processo de fabricação de queijo de coalho

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da Revista Caatinga- ISSN 1983-2125

DIAGNÓSTICO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO DE COALHO

Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira; Amanda Chagas da Silva; Maria das Graças Xavier de Carvalho.

RESUMO - As condições gerais e adequações quanto às Boas Práticas de Fabricação (BPF) foram averiguadas em oito queijarias artesanais de queijo de coalho, com o principal objetivo de investigar as conformidades e não conformidades relativas a sua implementação. Para tanto, usou-se como critério avaliativo um *checklist* baseado na Resolução – RDC nº 275 da ANVISA/MS. Os resultados mostraram que das oito queijarias, apenas uma classificou-se como de baixo risco, ou seja, com mais de 76% de adequações. Nos itens edificações e instalações, controle de pragas e da água, higiene dos manipuladores, ausência de tratamento térmico da matéria prima e documentação, as queijarias D e E apresentaram os maiores níveis de não conformidade. Conclui-se que as queijarias artesanais apresentam um alto risco para veiculação de Doenças Transmissíveis por Alimentos e, se faz necessária a adoção das BPFs pelas queijarias e uma maior fiscalização pelos órgãos oficiais, pois as inadequações observadas podem comprometer a qualidade dos produtos e a segurança dos consumidores.

Palavras-chave: contaminação. Controle de qualidade. Lista de verificação. Segurança alimentar.

DIAGNOSIS OF CONDITIONS HYGIENIC-SANITARY PROCESS COALHO CHEESE MANUFACTURING

ABSTRACT - The general conditions and adequacies regarding the Good Manufacturing Practices (GMP) were verified in eight artisanal curdled cheese factories with the objective to investigate the conformities and non-conformities related to its implementation. Therefore, it was used, as evaluation criteria, a checklist based on the Resolution – RDC number 275 of ANVISA/MS. The results showed that from the eight evaluated cheese factories, only one was classified as low risk, that is, with more than 76% of adequacies. On the edification and facilities aspects, plague and water control, handlers' hygiene, lack of thermal treatment of raw material and documents, cheese

factories D and E showed the highest levels of non-conformity. It can be concluded that artisanal cheese factories present a high risk for the propagation of Foodborne Diseases, so it is necessary the adoption of GMP by the cheese factories and a stricter supervision made by the official bodies since the verified inadequacies could compromise the quality of the products as well as the safety of consumers.

Keywords: contamination. Quality control. Checklist. Food security.

INTRODUÇÃO

O consumo de produtos lácteos no Brasil vem crescendo e o queijo de coalho destaca-se por ser utilizados em refeições e sanduíches (SOUZA et al., 2008). Além disso, queijos artesanais têm grande importância social, histórica e cultural.

Os queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. Estas condições podem ser agravadas, quando processados com leite cru, sem o emprego das Boas Práticas e tecnologia adequada ou sem se observar o tempo mínimo de maturação.

No contexto de segurança alimentar é importante a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), que consistem em procedimentos adequados para a produção e a manipulação de alimentos, e contribuem significativamente para evitar a ocorrência de doenças provocadas pelo consumo de alimentos contaminados e garantir a qualidade do produto final (SILVA; JINKINGS; SILVA, 2011).

Este programa consiste em um conjunto de princípios e regras para a correta manipulação de alimentos, considerando desde a matéria-prima até o produto final, envolvendo as condições estruturais, de armazenamento, higiênica, equipamentos e utensílios e do ambiente de trabalho, as técnicas de manipulação dos alimentos, a saúde e higiene dos funcionários, o controle da água utilizada e os cuidados com os vetores transmissíveis de doenças e pragas, além do tratamento de efluentes (BRASIL, 2004; QUINTÃO et al., 2013).

No Brasil, as BPF tornaram-se obrigatórias para a produção industrial de alimentos em 1997, quando foram publicadas as portarias 368/97, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e 326/97, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ligada ao Ministério da Saúde – MS, que abordam as BPF aprovando o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas em seus respectivos âmbitos de fiscalização, onde são estabelecidos os

requisitos gerais de higiene e boas práticas para alimentos elaborados/industrializados para o consumo humano.

A primeira etapa para a implantação das BPF é a realização de um diagnóstico das condições higiênico-sanitárias do estabelecimento, por meio de aplicação da lista de verificação ou *checklist*. A partir das informações identificadas, deve-se realizar um relatório com as não conformidades observadas e a indicação das ações corretivas que deverão ser adotadas, visando adequar o estabelecimento (COUTINHO et al., 2013).

Os benefícios da implantação das BPF refletem na elaboração de produtos de melhor qualidade e mais seguros, diminuindo a incidência de reclamações dos consumidores, ambiente de trabalho mais organizado, limpo e seguro (QUINTÃO et al., 2013).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar as condições das Boas Práticas de Fabricação em oito queijarias artesanais no sertão paraibano, usando como critério avaliativo a aplicação do *checklist* baseado na legislação sanitária vigente, de forma a verificar o nível de conformidades e não conformidades nos estabelecimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, foram pesquisadas oito queijarias artesanais, localizadas no sertão paraibano, entre os meses de janeiro a maio de 2014. As unidades foram codificadas como A, B, C, D, E, F, G e H.

A avaliação das BPF foi realizada através de observação direta nas queijarias e da aplicação de lista de verificação (*checklist*) proposta no Anexo II da Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro, da ANVISA (BRASIL, 2002) com o intuito de acompanhar as etapas e identificar possíveis conformidades e não conformidades com a legislação vigente.

A referida lista de verificação possui 172 itens, abordando tópicos relacionados à edificação e instalações, equipamentos, móveis e utensílios, manipuladores, produção e transporte do alimento e documentação. O *checklist* apresenta três respostas: Sim (itens conformes), Não (itens não conformes) e NA (itens que não se aplicam ao estabelecimento).

Na avaliação dos dados, para cada resposta SIM, foi atribuída a nota 1,0 (um), e para cada resposta NÃO, a nota 0,0 (zero). As respostas NA foram diminuídas do total de itens avaliados de forma a não penalizar a pontuação. Para o cálculo da porcentagem de itens conformes, foi empregada a Equação abaixo.

$$\text{Itens conformes \%} = \frac{\text{Total de SIM}}{\text{Total de itens} - \text{itens NA}} \times 100$$

A classificação do estabelecimento foi realizada com base na porcentagem de itens conformes, de acordo com o descrito na RDC nº 275/02 da ANVISA, na qual classifica os estabelecimentos em 3 grupos: grupo 1 (baixo risco, aqueles que atenderam entre 76 a 100% dos itens avaliados), grupo 2 (médio risco, aqueles que atenderam entre 51 a 75% dos itens) e ao grupo 3 (alto risco, aqueles que atenderam entre 0 a 50%). Os itens de verificação foram apresentados em valores absolutos e percentuais e utilizou-se a estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as queijarias avaliadas tratavam-se de unidades de pequeno porte, onde recebiam de 500 a 3.000 litros de leite diariamente, de administração familiar e apenas três (3) eram registradas no Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E.), que foram a B, F e H. As demais não contavam com nenhum tipo de fiscalização, o que caracteriza como estabelecimento clandestino.

Independente de sua forma de fiscalização, toda empresa do ramo alimentício tem como responsabilidade a qualidade de seus produtos. De acordo com Soares et al. (2012), os serviços de inspeção devem atuar como monitores da qualidade do leite e seus derivados, garantindo que todas as regras higiênico-sanitárias sejam atendidas pela indústria para que a saúde do consumidor seja preservada.

Através da classificação das queijarias quanto à adequação dos itens, demonstrada na Tabela 1, constatou-se que, das oito queijarias estudadas apenas uma pertencia ao grupo 1 (baixo risco), uma no grupo 2 (médio risco) e seis pertenciam ao grupo 3, ou seja, apresentaram alto risco para veiculação de doenças transmitidas por alimentos (DTA), demonstrando que ainda há muito para ser feito com relação as condições sanitárias das queijarias.

Tabela 1. Índice de conformidades com sua respectiva classificação das queijarias de queijo coalho quanto ao nível de implantação das BPF, em 2014.

Queijarias	Conformidades (%)	Classificação
A	39,1	Alto risco

B	63	Médio risco
C	42	Alto risco
D	12,3	Alto risco
E	5	Alto risco
F	78	Baixo risco
G	43,8	Alto risco
H	47,4	Alto risco

Quintão et al. (2013) constataram valores semelhantes ao avaliarem um laticínio no município de Rio Pomba- MG quanto à adequação às BPF. Os autores classificaram o laticínio quanto o grupo de alto risco, sendo impróprio para o processamento de alimentos. Foram detectados como itens de maior deficiência os relacionados aos vestiários e banheiros, o layout que proporcionavam a contaminação cruzada, a existência de pragas entre outros riscos químicos, físicos e microbiológicos.

No Gráfico 1, apresenta-se o percentual de conformidades e não conformidades de acordo com os itens edificações e instalações. Pode-se observar que apenas as queijarias B e F apresentaram percentual de conformidade maior que a não conformidade, com 58,4 e 75,8%, respectivamente, de adequações a legislação sanitária. As demais queijarias apresentaram inadequações, com destaque para as queijarias D e E que obtiveram percentuais de não conformidade de 91,1 e 93,8% respectivamente, ou seja, sem nenhuma estrutura necessária para garantir a segurança do produto.

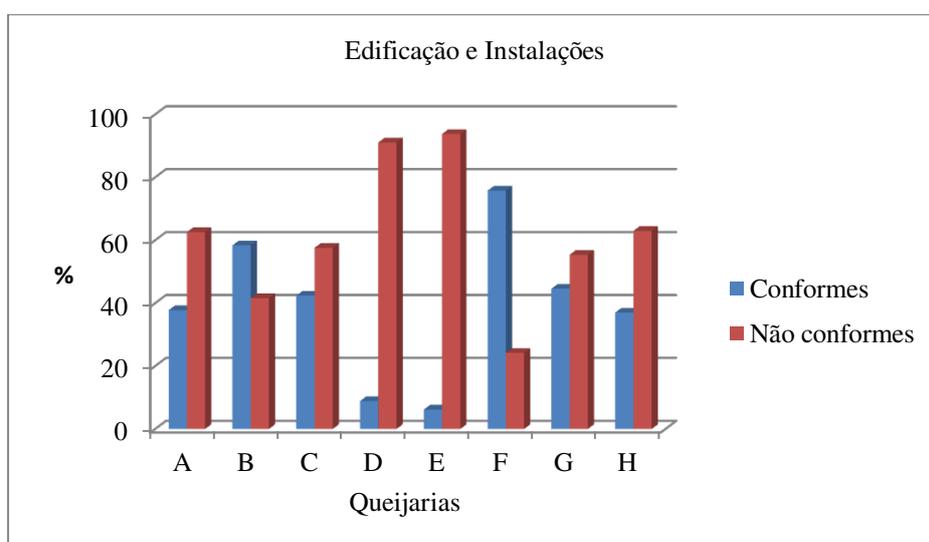


Gráfico 1. Condições de conformidades e não conformidades quanto ao item edificação e instalações em queijarias artesanais, em 2014.

Nessa etapa foram identificados problemas quanto à localização das queijarias, em terreno com poeira e muito barro, sem pavimentação (BRASIL, 1997). Quanto ao interior das queijarias, algumas apresentaram pisos em mal estado de conservação, quebrados, e que dificultava a limpeza, além de poder abrigar microrganismos patogênicos através do acúmulo de resíduos. Pisos irregulares e a utilização de drenos favorecem um ambiente para o crescimento bacteriano e constituem uma importante fonte de propagação de microrganismos (GILL, 2003).

Algumas janelas apresentavam-se com a tela de proteção rasgada, o que permite a entrada de pragas encontradas durante a verificação. Além disso, foram detectadas lâmpadas sem proteção, tetos e paredes com infiltrações e contaminadas com bolores. Silva et al. (2010) também destacam como falhas no controle de pragas a ausência de vedação na área de processo e a não implantação de medidas preventivas. Os mesmos autores encontraram condições semelhantes quanto a higienização ambiental (piso, parede, portas, etc) em 90% dos laticínios estudados.

Janelas e portas devem ser teladas milimetricamente e precisam estar em bom estado de conservação, para que minimizem a incidência de insetos, roedores e pragas nas dependências da fábrica e principalmente nas áreas de manipulação/elaboração dos alimentos (RIEDEL, 2005).

No quesito lavatório na área de manipulação, algumas unidades não apresentavam pias e, quando a mesma existia, não dispunha de sabonete líquido, anti-séptico, nem papel toalha descartável. A origem da água utilizada nas queijarias, na sua grande maioria, era proveniente de poços e cisternas, que não eram submetidas a análise laboratorial para verificação da potabilidade e não recebiam cloração.

A água pode ser contaminada no ponto de origem, durante a sua distribuição e, principalmente, nos reservatórios, sendo as causas mais frequentes dessa contaminação a carência de um programa de limpeza e desinfecção regular das caixas d'água e cisternas (SIQUEIRA et al., 2010; GERMANO; GERMANO, 2010). De acordo com Nascimento Neto (2006), mesmo que a água apresente resultados laboratoriais dentro dos padrões exigidos pela legislação, há a necessidade de realizar o tratamento para que não haja contaminação durante seu percurso de armazenagem e escoamento.

Para os itens equipamentos, móveis e utensílios, o percentual de conformidades e não conformidades apresentam-se no gráfico 2. Foi verificado que as queijarias D e E obtiveram os piores percentuais, com 89,5 e 100% de não conformidades respectivamente. Os maiores problemas identificados foram à precariedade na limpeza e sanitização desses equipamentos e utensílios, apresentando-se muitas vezes com acúmulo de resíduo de massa do queijo processado no dia anterior. Essas queijarias dispunham de utensílios de difícil higienização, como o uso de fôrmas, colheres e prensa de madeira. Além disso, faziam uso de material de limpeza sem registro e em dosagem incorreta.

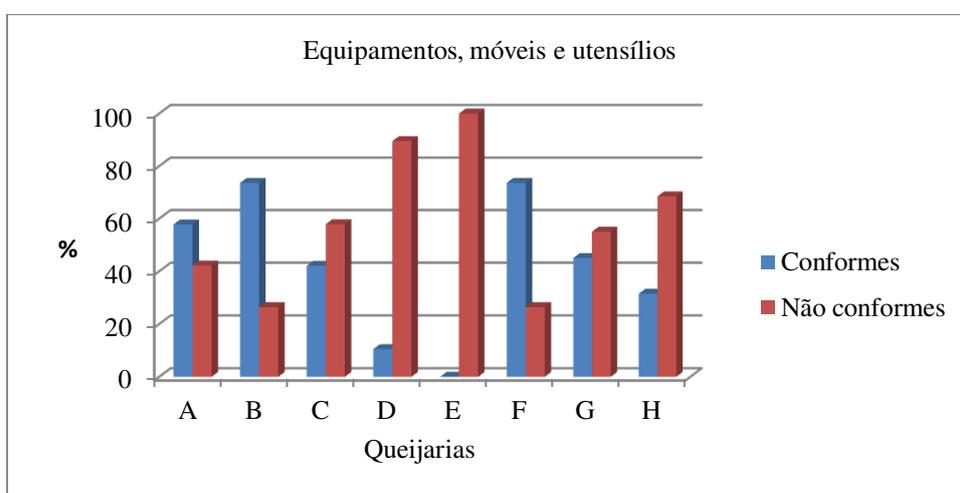


Gráfico 2. Condições de conformidades e não conformidades para o item equipamentos, móveis e utensílios em queijarias artesanais, em 2014.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Quintão et al. (2013) ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias em um laticínio em Minas Gerais, com percentual de 70% de não conformidades. Dias et al. (2012), também obtiveram um percentual alto de não conformidades para esse item, de 70%, em uma fábrica de queijo mussarela, no estado no Paraná.

A utilização de equipamentos e utensílios em condições precárias, com superfícies danificadas e com material poroso, pode causar acúmulo de resíduos e aumentar as chances de multiplicação microbiana (QUINTÃO et al., 2013). É importante ressaltar também que, de acordo com a legislação brasileira, é proibido o uso de madeira e outros materiais que não se possa limpar e desinfetar adequadamente.

O item que obteve as maiores percentagens de não conformidades foi o de higiene dos manipuladores, chegando até 90%, conforme Gráfico 3. Constatou-se que,

em algumas queijarias, os manipuladores não tinham a prática higiênica de lavar as mãos, seja por falta de estrutura que não dispunha de pias e sabonete para higienização ou falta de hábito. A falta de uniformização também foi um problema observado, assim como em situação precária ou sujos. Foi possível observar alguns funcionários utilizando adornos como brincos, alianças e relógios.

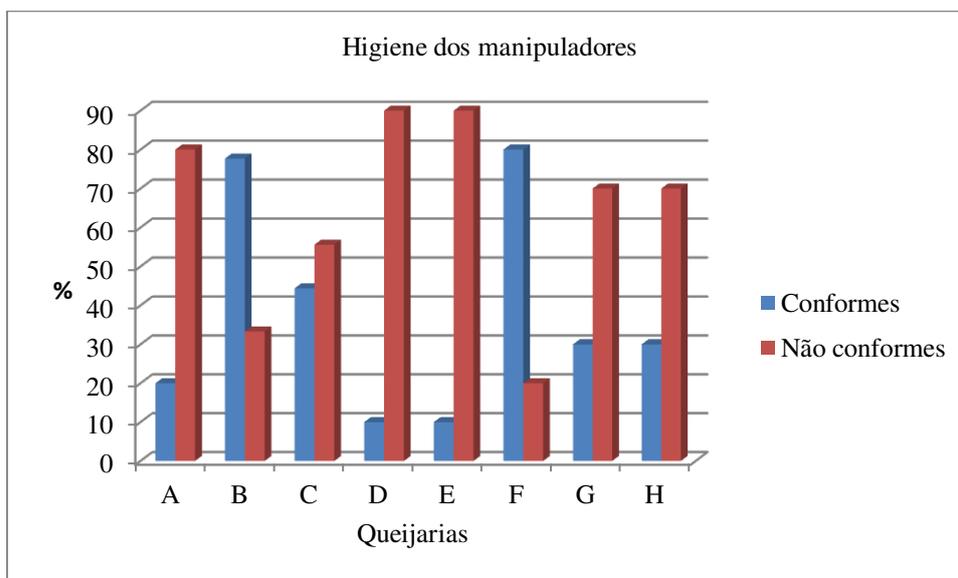


Gráfico 3. Análise de conformidades e não conformidades para o item higiene dos manipuladores em queijarias artesanais, em 2014.

Durante o processamento, observou-se que alguns manipuladores realizavam outras atividades fora da sala de processamento, como limpeza do estabelecimento e de utensílios, recepção da matéria prima, expedição, entre outros, o que o fazia transitar pelas diversas áreas do estabelecimento.

De acordo com Goés et al. (2001), os manipuladores de alimentos sem conhecimentos nessas áreas contribuem de forma significativa para a sua contaminação e, dificilmente, entenderão a importância que os mesmos representam na cadeia de transmissão. Souza (2006) relata a importância da capacitação para a motivação dos funcionários, assim como conscientização para as exigências higiênico sanitárias e o comprometimento dos manipuladores de alimentos.

No item produção e transporte do alimento, as queijarias A, C, D e E foram as que obtiveram maiores percentuais de não conformidades, conforme Gráfico 4. No processo de recepção do leite foram encontradas falhas como a não realização de testes

de plataforma para verificação da qualidade dessa matéria prima e, conseqüentemente, não havia reprovação de leites que poderiam estar ácidos ou com alguma adulteração.

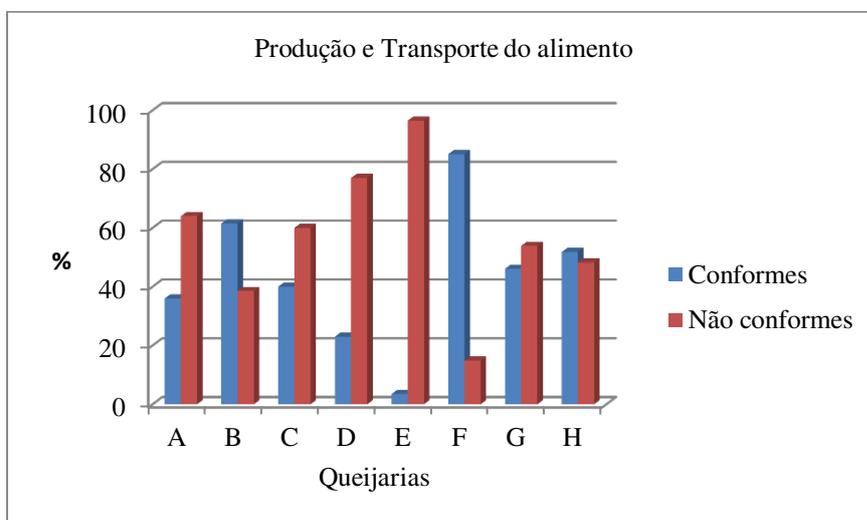


Gráfico 4. Análise de conformidades e não conformidades para o item produção e transporte do alimento em queijarias artesanais, em 2014.

O tempo para a recepção do leite muitas vezes era superior as duas horas permitidas pela Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2011) e em recipientes não recomendadas como tambores plásticos reaproveitados de outros produtos e garrafas pet sem qualquer refrigeração.

Outra observação alarmante foi o fato de nenhuma queijaria realizar tratamento térmico (pasteurização) no leite antes da elaboração do queijo, mesmo aquelas queijarias que tinham registro no serviço de inspeção. Queijos fabricados com leite não pasteurizado, seguindo processamentos tradicionais podem possuir uma microbiota diversificada e pode ser uma fonte de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outros (BORELLI et al., 2011). A legislação brasileira proíbe a fabricação do queijo de coalho a partir de leite cru, exceto para os queijos que têm um período de maturação superior a 60 dias (BRASIL, 2001).

Quanto aos queijos, também não havia controle de qualidade do produto final e nem rotulagem. A distribuição para comercialização do queijo era feita em caixas isotérmicas (isopor), sem controle da temperatura e em veículos que transportavam também passageiros. Diante disso, diversos motivos podem influenciar a qualidade final do produto, tais como: condições higiênico-sanitárias em que o leite foi obtido, pelo

processamento na indústria, pelas condições de sanificação do ambiente, qualidade da água e pelo armazenamento e transporte da matéria-prima e do produto (ICMSF, 1997).

Em relação ao item de documentação das BPF's, nenhuma das queijarias pesquisadas apresentou o Manual de Boas Práticas e os Procedimentos Padrões de Higiene Operacionais (PPHO). Essa falta de registro por parte das empresas tem sido descrita por diversos autores, tanto em fábricas de queijo (DIAS et al., 2012; SANTOS; HOFFMANN, 2010) como em laticínios (QUINTÃO et al., 2013, SILVA et al., 2010). Documentação e registros são uma das seções mais importantes na implantação das BPF, porque fornece descrição de procedimentos da matéria prima, da manutenção de equipamentos e de práticas de higiene diária para garantir a segurança alimentar.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2004), todo estabelecimento produtor de alimentos deve possuir um Manual de Boas Práticas de Fabricação, descrevendo como devem ser as operações realizadas pela indústria.

CONCLUSÃO

Do ponto de vista das Boas Práticas e segurança alimentar, conclui-se que das oito queijarias avaliadas, sete apresentaram baixo nível de conformidades de acordo com o *checklist* aplicado, apresentando muitos problemas que comprometem a qualidade dos produtos e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores.

O *checklist* aplicado foi um instrumento para diagnóstico que pode avaliar a real situação e possíveis problemas e necessidades desses estabelecimentos, detectando erros desde os procedimentos técnicos, inadequações das instalações, controle de uniformização e higiene pessoal, controle da matéria prima e do produto pronto para o consumo, qualidade da água e ausência de pasteurizador.

Diante disso, há necessidade de uma maior fiscalização, assim como registro dos estabelecimentos no serviço de inspeção, para que os riscos de contaminação sejam minimizados, a fim de garantir a comercialização de produtos seguros e de qualidade.

REFERÊNCIAS

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a

traditional minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, vol.63, n. 2, p. 481-487, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 jul.2001a, p.13-15.

BRASIL. Portaria n. 326. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 jul. 1997.

BRASIL. Resolução RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 21 out. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 set. 2004.

COUTINHO, E. P.; ISHIHARA, Y. M.; OLIVEIRA, L. A.; FERREIRA, V. C. S.; MOREIRA, R. T.; SILVA, J. M. Aplicação de *checklist* para avaliação das Boas

Práticas em Padaria da cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 27, n. 220/221, p. 56-61, 2013.

DIAS, M. A. C.; SANT'ANA, A. S.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BONA, E. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. **Food Control**. v. 24, p. 199-205, 2012.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 5 ed. São Paulo: Varela, 2010. 1088p.

GILL, C. O. Visible Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. **Meat Science**. Barking, v. 65, p. 1005-1011, nov 2003.

GÓES, J. A. W.; FURTUNATO, D. M. N.; VELOSO, I. S.; SANTOS, J. M. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.20-22. 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos**. Varela, São Paulo. 1997. 377p.

NASCIMENTO NETO, F. **Recomendações básicas para aplicação de Boas Práticas agropecuárias e de fabricação na agroindústria familiar**. Brasília. Embrapa, 2006. 236p.

QUINTÃO, C. S. C.; PEREIRA, D. C. S.; SILVÉRIO, A. F.; REIS, M. R. R.; MARTINS, A. D. O.; MARTINS, M. L. Avaliação das Boas Práticas de Fabricação em Laticínio do Município de Rio Pomba, MG. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 27, n. 226/227, p. 69-72, 2013.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu. 2005. 455p.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Avaliação das Boas Práticas de Fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 222-228, 2010.

SILVA, A. M.; JINKINGS, J. C.; SILVA, J. M. A. Avaliação das Boas Práticas em duas Panificadoras do Município de Porto Velho – RO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 83-88, 2011.

SILVA, F. T.; FARIAS, A. V.; NASCIMENTO NETO, F.; MACHADO, R. L. P. Boas Práticas de Fabricação em laticínios: principais não conformidades. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 24, n. 180/181, p. 52-58, 2010.

SIQUEIRA, L. P.; SHINOHARA, N. K. S.; LIMA, R. M. T.; PAIVA, J.E.; LIMA FILHO, J.L.; CARVALHO, I. T. Avaliação microbiológica da água de consumo empregada em unidades de alimentação. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 63-66, 2010.

SOARES, A. K. C.; CORREIA, L. J. H.; NUNES, E. D.; BRASIL, L. M. S. Boas Práticas de Fabricação em quatro usinas de beneficiamento de leite de cabra no Cariri Paraibano. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 26, n. 214/215, p. 208-212, 2012.

SOUZA, L. H. L. A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n.146, p. 32-39. 2006.

SOUZA, T.B.; CRUZ, A. G.; MOURA, M. R. L.; VIEIRA, A. C. M.; SANT'ANA, A. S. Microscopic quality indicators of minas frescal cheese. **Food Control**, Reading, v.19, n.1, p. 71-75, 2008.

Capítulo II

Pontos de contaminação microbiológica em queijarias artesanais de queijo de coalho

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia- ISSN 1678-4162

Pontos de Contaminação Microbiológica em Queijarias Artesanais de Queijo de Coalho
Microbiological Contamination Points in Artisanal Cheese-Making Coalho Cheese Production

S. C. P. L. Oliveira*, A. C. Silva, M. G. X. Carvalho

Universidade Federal de Campina Grande – UFCG- Patos, PB.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido visando identificar os principais pontos de contaminação microbiológica do queijo de coalho em queijarias artesanais do Sertão paraibano, através da quantificação de coliformes, mesófilos, *Escherichia coli* e identificação de *Staphylococcus* spp. Analisaram-se amostras de leite, queijos, swabs do tanque de fabricação, mesa, fôrma e mãos dos manipuladores, além da água utilizada na fabricação e limpeza dos equipamentos. Os resultados demonstraram que o leite cru de todas as queijarias apresentou alta contaminação microbiológica, estando em desacordo com as normas vigentes. A superfície da mesa, tanque, fôrma e mãos dos manipuladores também apresentaram altas contagens para todos os micro-organismos. No queijo foram detectadas coliformes a 30° C, termotolerantes e *E. coli*. As contagens de *Staphylococcus* spp. apresentaram acima de $1,3 \times 10^5$ UFC/g, podendo favorecer a produção de enterotoxinas sob condições adequadas. Os principais agentes isolados nas amostras foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*. O leite apresentou *S. aureus* em todas as queijarias, porém, no queijo houve predomínio de espécies coagulase negativa, sendo também encontradas nos utensílios e mãos dos manipuladores. O principal ponto de contaminação nas queijarias foi o leite cru recebido pelos estabelecimentos, o que serviu como o principal foco de contaminação dos utensílios, equipamentos e mãos dos manipuladores. As condições higiênico-sanitárias encontravam-se inadequadas, contribuindo desta forma, para a permanência e propagação desses microrganismos no interior das queijarias.

Palavras-chave: lácteos, qualidade higiênico-sanitária, utensílios, manipuladores.

ABSTRACT

This work aimed to identify the main spots of microbiological contamination of curdled cheese in artisanal cheese factories in the Sertão of Paraíba, through the quantification of coliforms, mesophilic, *Escherichia coli* and identification of *Staphylococcus* spp. It

was analyzed milk samples, cheese, swabs from the fabrication tank, table, mold, handlers' hands, as well as the water used in the fabrication and cleaning of the equipment. The results showed that the raw milk from all the cheese factories presented high microbiological contamination, therefore being in discordance with the current regulation. The surface of the table, tank, mold and handlers' hands also showed high rate of all microorganisms. On the cheese it was detected thermotolerant coliforms at 30° C and also *E. coli*. The counts for *Staphylococcus* spp. showed more than $1,3 \times 10^5$ UFC/g, which favors the production of enterotoxins under adequate conditions. The main isolated agents on the samples were *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*. The milk indicated *S. aureus* in all cheese factories. . However, on the cheese there was a predominance of coagulase-negative specimens, which were also found in utensils and handlers' hands. The main contamination spot in the cheese factories was the raw milk received by the establishment, which served as the main focus of contamination of utensils, equipment and handlers' hands. The hygienic and sanitary conditions were inadequate, contributing for the permanence and propagation of microorganisms inside the cheese factories.

Key-words: hygienic quality, coliforms, handlers, utensils.

INTRODUÇÃO

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades da indústria de produtos lácteos. Na região Nordeste do Brasil, o queijo de coalho está entre os mais consumidos e produzidos, sendo, há mais de 150 anos fabricado em vários estados a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado (Teshima *et al.*, 2004).

O queijo de coalho, tanto artesanal quanto industrial, por ser bastante manipulado e muitas vezes elaborado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pode ser um produto que não apresenta segurança microbiológica e padronização, sendo a questão microbiológica de grande importância para a saúde pública pelo risco de causar infecções e intoxicação alimentares aos consumidores (Andrade *et al.*, 2011).

Diversas pesquisas têm avaliado a qualidade microbiológica desses queijos em várias regiões do Brasil e, particularmente, os de massa crua no Nordeste (Sousa *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Tigre e Borelly, 2011; Borges *et al.*, 2008). No entanto, poucos trabalhos apontam quais as fontes de sua contaminação dentro do processo de fabricação. Essas contaminações podem ocasionar perdas de ponto de vista econômico, assim como problemas para a saúde coletiva e, por isso,

torna-se importante determinar os pontos de maior risco de contaminação e monitorá-los (Furtado, 2005).

Queijos fabricados com leite não pasteurizado, seguindo processamentos tradicionais podem possuir uma microbiota diversificada e pode ser uma fonte de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outros (Borelli et al., 2011). A legislação brasileira permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto (Brasil, 2013).

Devido ao grande consumo de queijo de coalho não só no Nordeste, mas em todo o Brasil e de sua importância cultural aliado aos diferentes processos de fabricação, objetivou-se identificar os principais pontos de contaminação na produção de queijo de coalho, determinando a origem e as etapas passíveis de contaminação em queijarias artesanais.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite, queijos e utensílios foram colhidas em três queijarias artesanais, denominadas A, B e C, localizadas no Sertão paraibano, durante o período de fevereiro a maio de 2014. Não foram criados critérios probabilísticos para a escolha das queijarias estudadas, sendo a inclusão das mesmas feita com base no relacionamento prévio com os proprietários. O estudo foi conduzido com três repetições, ou seja, três coletas em cada queijarias em dias diferentes.

As queijarias apresentavam as seguintes características:

Queijaria A: assemelhava-se a granja leiteira conforme IN 62 (Brasil, 2011), pois produzia e processava seu próprio leite, elaborando o queijo logo após a ordenha, porém não realizava a pasteurização e não tinha registro no serviço de inspeção.

Queijaria B: Captação de leite de vários produtores; recepção do leite em baldes, sem refrigeração. Não pasteurizava o leite, porém havia registro no serviço de inspeção estadual.

Queijaria C: Captação de leite de vários produtores; recepção do leite em baldes, sem refrigeração. Não pasteurizava o leite; não havia registro no serviço de inspeção.

As amostras do tanque de fabricação, da mesa, da forma e das mãos dos manipuladores foram coletadas após a higienização e antes do início das atividades

através da fricção de um swab estéril na área amostrada (equivalente a uma área de 10 cm²) com pressão constante, em movimentos giratórios. A parte manuseada da haste do swab foi quebrada na boca interna do frasco contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril.

As amostras de leite “in natura” e da água utilizada na limpeza de equipamentos e na fabricação do queijo foram coletadas utilizando-se frascos estéreis e as amostras de queijo foram coletadas na própria embalagem de fabricação. Todo o material foi transportado em caixas isotérmicas contendo gelo, até o laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos-PB.

As amostras foram diluídas em série com solução salina estéril, na proporção de 1/9, sendo 25g diluídas em 225 mL de água peptonada a 0,1% para amostras sólidas ou 1 mL em 9 mL para amostras líquidas. Em seguida, foram avaliadas quanto ao número mais provável de coliformes a 35° C, coliformes a 45° C, *E. coli* e Contagem de micro-organismos mesófilos, segundo metodologia descrita pelo Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos (Silva et al., 2007).

Para a quantificação de *Staphylococcus* spp. utilizou-se o método de contagem “Spread-plate” em Ágar Baird Parker (BP) com gema de ovo e telurito de potássio a 3,5%, em triplicata, depositando-se 0,2 mL, 0,2 mL e 0,3 mL de cada diluição, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ respectivamente, sobre a superfície do ágar e, com auxílio da alça de Drigalsky, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio até a completa absorção. As placas foram incubadas, em estufa, a 37°C, por 24 - 48 horas. Foram selecionadas as placas contendo entre 25 e 250 colônias para contagem. Selecionou-se três colônias típicas de cada placa e inoculou-se em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), que foram incubados a 37°C por 24 horas. A partir do subcultivo crescido em BHI, foram submetidas à análise de identificação das espécies com o auxílio do equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens) o qual é baseado na utilização de painéis (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimétricos de provas bioquímicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se que o leite cru apresentou uma alta contaminação microbiológica na recepção das três queijarias estudadas para todos os micro-organismos pesquisados, sugerindo que pode ter ocorrido deficiência higiênica na ordenha, transporte de leite cru em temperatura inadequada ou refrigeração ineficiente,

fatores que contribuem para a multiplicação microbiana. A média da contagem de aeróbios mesófilos foi de $3,7 \times 10^7$, $2,2 \times 10^8$ e de $8,1 \times 10^7$ UFC/mL nas queijarias A, B e C, respectivamente, apresentando-se acima do permitido para legislação de leite cru, que é de até $3,0 \times 10^5$ UFC/mL (Brasil, 2011). Na Tabela 1 são apresentados os resultados da contagem média de aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* spp.

Tabela 1. Contagem média de aeróbios mesófilos e *Staphylococcus* spp em amostras de leite cru, queijo, mãos e utensílios na produção de queijo de coalho, em três queijarias no sertão paraibano, em 2014.

Fontes de contaminação	Mesófilos (UFC/g/mL ou cm ²)			<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/g/mL ou cm ²)		
	A	B	C	A	B	C
Leite cru	$3,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	1×10^4	$3,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Queijo	n. r	n. r	n. r	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Mãos (UFC/mão)	$1,9 \times 10^4$	7×10^4	$1,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
Mesa	8×10^5	4×10^5	$1,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
Tanque	$7,1 \times 10^3$	$4,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	4×10^2
Fôrma	$3,8 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	3×10^3	$3,5 \times 10^3$

n. r.: não realizado

Já a análise das mãos de manipuladores e das superfícies da mesa, do tanque e das fôrmas evidenciaram alta contagem de micro-organismos mesófilos no interior das queijarias. A presença de micro-organismos em equipamentos, utensílios, tubulações e até mesmo no tanque, pode ser consequência da formação de biofilmes bacterianos na superfície. Esses biofilmes podem se desprender, em parte, contaminando o produto no decorrer de seu processamento (Silva, 2013). Condições inadequadas de higiene em ambientes podem contribuir para a contaminação cruzada dos produtos, bem como diminuir sua vida de prateleira e aumentar o risco de infecção alimentar. Para reverter as condições insatisfatórias detectadas é necessário a adoção de medidas corretivas por meio de treinamento e implantação de boas práticas de fabricação (Silva *et al.*, 2011).

Nas três queijarias, pode-se perceber que o leite cru é uma importante via de entrada dos *Staphylococcus* spp., com contagens médias variando entre $1,0 \times 10^4$ na queijaria A, $3,3 \times 10^4$ na queijaria B e $1,3 \times 10^4$ UFC/mL na queijaria C. Apesar da exigência que o leite destinado a fabricação de queijos seja submetido à pasteurização, em todas as unidades de produção estudadas, o queijo era produzido a partir de leite não submetido a tratamento térmico, o que aumenta os riscos ao consumidor.

Era esperado que na queijaria A os índices de contaminação por estafilococos fossem baixos, devido a produção ser de um único rebanho, com o leite recém-

ordenhado chegando ao beneficiamento por meio de um sistema de tubulação fechada. A alta contagem apresentada no leite pode sugerir que haja problemas higiênico-sanitários na ordenha e no rebanho.

Borges *et al.* (2008) encontraram um alto nível de contaminação no leite cru, com contagens variando de $3,3 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL para *Staphylococcus* sp. e de $8,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, para *Staphylococcus* coagulase positiva em 100% das amostras estudadas. Níveis superiores a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL podem favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócica sob condições ambientais adequadas.

As bactérias patogênicas no leite cru são uma preocupação de saúde pública, sendo um risco para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados, e até para quem o manuseia. O leite cru contaminado pode ser fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria (Arcuri *et al.*, 2006).

As amostras de queijo apresentaram elevada população de *Staphylococcus* spp. em todas as queijarias, com contagens acima de $1,3 \times 10^5$ UFC/g. Esse nível de contaminação por *Staphylococcus* spp. é considerado alto e pode favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócicas sob adequadas condições ambientais (pH, temperatura, atividade de água etc.). Essa contaminação pode ser atribuída à prevalência do gênero *Staphylococcus* na natureza e a falhas durante o processamento, desde a obtenção higiênica do leite até o produto final (Andrade *et al.*, 2011). Resultado semelhante foi encontrado por Rapini *et al.* (2002), que avaliaram amostras de queijo de coalho, comercializados nas praias de Salvador e Maceió, e constataram elevada população de *Staphylococcus* spp. ($4,7 \times 10^4$ UFC/g a $2,0 \times 10^7$ UFC/g) em 100% das amostras. Altas contagens de *Staphylococcus* spp. também tem sido observadas por Andrade *et al.* (2011) em amostras de queijo de coalho, comercializadas em Fortaleza, CE, que variaram entre $1,3 \times 10^6$ UFC/g a $6,6 \times 10^9$ UFC/g.

As vias de contaminação dos queijos podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. Algumas irregularidades foram observadas durante o processamento dos queijos. Em todas as queijarias verificou-se a presença de massa de queijo ressecada nas paredes do tanque, as formas utilizadas para a enformagem dos queijos eram lavadas com detergente e água apenas na hora de colocar a massa de queijo e não ficavam em nenhum momento submersas em solução sanitizante. Apenas os dessoradores ficavam submersos em solução de hipoclorito de sódio, porém a solução era feita de maneira empírica.

Dentre os utensílios analisados, foi encontrada a maior contaminação por *Staphylococcus* spp. na mesa, com médias que variaram entre $2,3 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^5$ UFC/cm². Destaca-se também a elevada contagem nas fôrmas, principalmente da queijaria A, com média de $2,3 \times 10^4$ UFC/cm². Nesta queijaria era utilizada a fôrma de madeira, que é proibido pela legislação.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Zegarra *et al.* (2009), que observaram o crescimento de *Staphylococcus* spp. em todas as etapas de produção, incluindo o leite de vacas com mastite e do latão, utensílios e das mãos de manipuladores. Na pesquisa realizada por Silva *et al.* (2011) foi detectada a presença de *Staphylococcus* spp. em todos os equipamentos e utensílios (fôrmas, mesa, tanque e prateleira) em 10 laticínios da região de Rio Pomba-MG e *Staphylococcus* coagulase positiva nas mesas de dois laticínios, com contagem de $1,2$ a $1,3 \times 10^2$ NMP/cm².

Os resultados demonstrados na Tabela 2 mostram os principais agentes isolados em queijo, leite e diversos utensílios em diferentes etapas do processo de fabricação do queijo de coalho. O perfil foi bastante diversificado. Entre os 51 isolados característicos de *Staphylococcus* spp. avaliados, foram identificadas 13 espécies, sendo três coagulase positiva e dez coagulase negativa.

Tabela 2. Espécies de *Staphylococcus* isolados do leite, queijo, mãos de manipuladores e utensílios utilizados na linha de produção do queijo de coalho, em três queijarias do sertão paraibano, em 2014.

Amostras	Queijarias		
	A	B	C
Leite Cru	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis hominis</i>	<i>S. hominis hominis</i>
Queijo	<i>S. cohnii cohnii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. sciuri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>
		<i>S. sciuri</i>	<i>novobiocepticus</i>
			<i>S. aureus</i>
Mãos	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. aureus</i> (2)	<i>S. aureus</i> (2)	<i>S. aureus</i> (2)
		<i>S. xylosum</i>	<i>S. hominis hominis</i>
Mesa		<i>S. epidermidis</i>	
	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. sciuri</i>
	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. xylosum</i>
Tanque	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
	<i>S. cohnii urea</i>	<i>S. lugdunensis</i> (2)	<i>S. lugdunensis</i>
	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. sciuri</i>
	<i>S. epidermidis</i>		

Fôrma	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> (2)	<i>S. schleiferi</i>
	<i>S. aureus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>coagulans</i>
	<i>S. lugdunensis</i>		<i>S. haemolyticus</i>
			<i>S. aureus</i>

O *S. aureus* foi identificado no leite recebido pelas três queijarias, como também outras espécies de estafilococos. As principais causas de contaminação com micro-organismos patogênicos é o uso de leite cru associado a práticas higiênicas insatisfatórias durante a ordenha, estocagem, transporte, processamento ou a contaminação cruzada (Vanetti, 2003).

No queijo, houve predomínio de espécies coagulase-negativa, estando em 64% das amostras. Apesar de ter havido uma diminuição dos *S. aureus*, os mesmos foram encontrados nos queijos das queijarias B e C. Esse mesmo micro-organismo também foi encontrado nas mãos dos manipuladores dos mesmos estabelecimentos, sugerindo que houve uma manipulação exacerbada e falha na higiene pessoal. É necessário frisar que a partir do momento em que as mãos estão contaminadas, o pessoal envolvido pode espalhar esse micro-organismo para toda a indústria. O homem é reservatório e principal veiculador de *S. aureus* em alimentos, devido a esse micro-organismo ser comumente encontrado nas fossas nasais, garganta e pele (Jay, 2005).

Neste estudo, o *S. aureus* também foi isolado na mesa e nas fôrmas, porém não foi identificado no tanque de nenhuma queijaria, sendo encontradas apenas espécies coagulase-negativas.

Borges *et al.* (2008) relatam que prevalência de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa, com potencial enterotoxigênico, como *S. cohnii cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, nas amostras da linha de produção de queijo de coalho, pode representar um risco em potencial para a produção de enterotoxinas no produto final, sob condições adequadas de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, atividade de água e concentração de cloreto de sódio. Eles recomendam que a presença de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa não seja ignorada em investigações de casos suspeitos de intoxicação estafilocócica, uma vez que este grupo de patógenos, presente no alimento, oferece risco de causar intoxicação ao consumidor.

Na Tabela 3 é apresentado o Número Mais Provável de coliformes a 35° C, de coliformes a 45° C e de *E. coli*. Pode-se observar que nas três queijarias foi encontrado o leite cru com alto índice de coliformes à 35° C, assim como também apresentou

contaminação de origem fecal, com contagens médias de $1,1 \times 10^3$, $1,5 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^2$ NMP/mL nas queijarias A, B e C respectivamente.

Tabela 3. Média de Número Mais Provável de coliformes a 35° C, de coliformes a 45° C e de *Escherichia coli* em amostras de leite cru, queijo, mãos, utensílios e água na produção de queijo de coalho, em três queijarias no Sertão paraibano, em 2014.

Fontes de contaminação	Coliformes a 35° C (NMP/g/mL ou cm ²)			Coliformes a 45° C (NMP/g/mL ou cm ²)			<i>Escherichia coli</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Leite cru	4,4 x 10 ³	3,6 x 10 ³	8,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²	Positivo	Negativo	Positivo
Queijo	4 x 10 ³	7,4 x 10 ²	1,1 x 10 ⁴	1,2 x 10 ¹	3,8 x 10 ²	5,2 x 10 ²	Positivo	Positivo	Negativo
Mãos (UFC/mão)	2,2 x 10 ¹	3,7 x 10 ²	3,8 x 10 ²	0	5 x 10 ⁰	3,1 x 10 ¹	Negativo	Negativo	Negativo
Mesa	7,7 x 10 ³	3,6 x 10 ²	3,7 x 10 ²	3,6 x 10 ³	3 x 10 ⁰	9,6 x 10 ⁰	Negativo	Negativo	Negativo
Tanque	7,6 x 10 ⁰	6,2 x 10 ¹	4,1 x 10 ¹	0	3,1 x 10 ¹	0	Negativo	Positivo	Negativo
Fôrma	9 x 10 ¹	7,6 x 10 ⁰	3 x 10 ⁰	3,1 x 10 ¹	0	0	Negativo	Negativo	Negativo
Água	2,5 x 10 ¹	4,0 x 10 ¹	2,7 x 10 ⁰	0,1 x 10 ⁰	1,0 x 10 ⁰	1,0 x 10 ⁰	Positivo	Positivo	Negativo

Na legislação brasileira não há parâmetros para esses micro-organismos em leite cru refrigerado, uma vez que já são esperados em produtos ainda não processados. Vários autores avaliaram a qualidade do leite cru e detectaram a presença de coliformes e outros patógenos, dados que reforçam o fato do leite cru não ser indicado para o consumo, pois pode trazer riscos à saúde humana (Zegarra *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2009; Maciel *et al.*, 2008).

Em relação as superfícies pesquisadas e mãos dos manipuladores, foi encontrado um elevado número de coliformes a 35°C. Já para os coliformes a 45° C só não foram detectados nas mãos dos manipuladores da queijaria A, no tanque das queijarias A e C e na fôrma das queijarias B e C. A presença destes indica que houve deficiência na higienização dos equipamentos e manipuladores.

Para a contagem de Coliformes a 35° C nos queijos, a média das amostras das queijarias A e B apresentaram de acordo com os padrões estabelecidos pelo

Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, Portaria N° 146 de 07/03/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece um máximo de 5×10^3 NMP/mL para queijos de média a alta umidade (Brasil, 1996). A queijaria C apresentou média superior, ficando fora dos padrões. Os coliformes são facilmente destruídos com a pasteurização, no entanto, em nenhuma das queijarias era realizado esse tratamento térmico, o que torna possível esse nível de contaminação.

Para a contagem de coliformes a 45° C, verificou-se que as amostras de queijo das queijarias A e B apresentaram média dentro dos padrões exigidos pelo MAPA que determina um máximo de 5×10^2 NMP/mL (Brasil, 1996), porém foi identificado a presença de *E. coli*, o que torna o produto impróprio para o consumo. A média das amostras da queijaria C, apesar de estar acima do permitido pela legislação não apresentaram *E. coli*. É importante ressaltar que esses micro-organismos também são chamados de indicadores e quando presentes no alimento, fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal (Pietrowski *et al.*, 2008).

Resultados apresentados por Santana *et al.* (2008), analisando 60 amostras de queijo de coalho na cidade de Aracaju- SE, demonstraram que 93,3% das amostras estavam acima do limite de tolerância para coliformes termotolerantes, não estando aptos à comercialização. Silva *et al.* (2010), ao comparar o queijo de coalho produzido com leite cru e com leite pasteurizado em três laticínios no sertão de Alagoas, evidenciaram que em ambos os produtos havia elevadas contagens de coliformes a 35° C, coliformes a 45° C e *E. coli*.

Nas amostras de água das três queijarias nenhuma apresentou ausência para coliformes a 35° C e 45° C. A legislação brasileira (Brasil, 2011) estabelece um padrão de potabilidade para esses micro-organismos, no qual exige ausência em 100 mL para ambos. Portanto, as amostras das queijarias apresentaram resultados fora dos padrões, o que indica má higienização das caixas d'água, tubulações velhas em má conservação, falhas no tratamento da água ou até mesmo ausência de clorador nos reservatórios. A presença de *E. coli* foi detectada na água das queijarias A e B, sendo um resultado insatisfatório, uma vez que a presença desse micro-organismo pode causar danos à saúde do consumidor. Este fato indica a necessidade de algumas adequações como utilização frequente de clorador nos reservatórios e monitoramento periódico da qualidade sanitária.

Na região de São José do Rio Preto- SP, Santos e Hoffmann (2010) avaliaram a qualidade higiênico-sanitária da água em um laticínio de pequeno porte e obtiveram resultados insatisfatórios quanto a potabilidade, apresentando-se inadequada para o consumo devido à presença de coliformes termotolerantes. Em Rio Pomba- MG, Chaves *et.al.* (2010) analisaram amostras de águas de dez laticínios, sendo estas amostras oriundas de poços artesianos sem nenhum tipo de tratamento e constataram que apenas duas apresentaram-se dentro dos padrões de potabilidade. Segundo os autores o alto índice de contaminação nas águas é devido ao fato dos laticínios não utilizarem procedimentos operacionais de produção e de higienização e nem aplicarem as Boas Práticas de Fabricação.

CONCLUSÕES

O principal ponto de contaminação nas queijarias foi o leite cru recebido pelos estabelecimentos, o que serviu como o principal foco de contaminação dos utensílios, equipamentos e mãos dos manipuladores. As condições higiênico-sanitárias encontravam-se inadequadas, contribuindo desta forma, para a permanência e propagação desses microrganismos no interior das queijarias, fazendo com que o queijo produzido sob essas condições estivesse inadequado para o consumo.

Para reverter tais condições é necessária a adição de medidas corretivas por meio de treinamento e implantação de Boas Práticas de Fabricação desde a obtenção do leite até o produto final, além de fiscalização pelos órgãos competentes para que impeçam a produção e comercialização de produtos contaminados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. P. C.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. *et al.* Perfil de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Negativa Contaminantes de Queijo de Coalho. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical*. 18 p. 2011.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F. *et al.* Qualidade Microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R. *et al.* Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional minas cheese. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, vol.63, n. 2, p. 481-487, 2011.

BORGES, M. F., NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciênc. Rural*, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996, Seção 1, p.3977-3978.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa n°30, de 26/06/ 2001. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 jul.2001a, p.13-15.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N°2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acessado em: 25 out. 2014.

CAMPOS, M. R. H.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; BORGES, L. J. *et al.* Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.*, v.61, n.5, p.1203-1209, 2009.

CHAVES, K. F.; SILVA, N. B. N.; VIEIRA, T. B. *et al.* Microbiológica da Água Empregada em Laticínios da Região de Rio Pomba-MG. *Científ. Ciênc. Biol. e da Saúde*, v. 12, n. 4, p. 5-8, 2010.

FURTADO, M. M. *Principais problemas dos queijos: causas e prevenção*. 2 ed. Fonte Comunicações e Editora, São Paulo, 2005, 200p.

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

MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S. *et al.* Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga- BA. *Rev. Bras. de Saúde e Prod. Animal*, v.9, n.3, p. 443-448, 2008.

PEIXOTO, J. P. N.; NASCIMENTO, J. W. B.; FURTADO, D. A. F. *et al.* Qualidade do ambiente e níveis de contaminação por micro-organismos em queijarias, no agreste paraibano. *Rev. Bras. de Prod. Agroind.*, v.14, n.2, p.177-183, 2012.

PIETROWSKI, G.A.M.; OTT, A.P.; SIQUEIRA, C.R. *et al.* Avaliação da Qualidade Microbiológica de Leite Pasteurizado Tipo C Comercializado na Cidade de Ponta Grossa-PR. In: VI SEMANA DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS. 2008, Paraná. *Anais...Ponta Grossa*, 2008. v. 02, n. 36.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo Coalho. *Rev. Inst. Lat. Când. Tostes*, v. 57, n. 327, p. 60-65, 2002.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracajú, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. *Rev. Inst. Ad. Lutz*, v. 69, n. 1, p. 38-46, 2010.

SILVA, G. O. *Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo Minas frescal no estado de São Paulo*. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I. *et al.* Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. *Rev. Inst. Ad. Lutz*, v. 69, n. 2, p. 214-21, 2010.

SILVA, N. B. N.; CHAVES, K. F.; GRAVINA, C. S. *et al.* Avaliação Microbiológica de equipamentos e utensílios utilizados em laticínios da região de Rio Pomba- MG. *Rev. Inst. Lat. Când. Tostes*, v. 66, n.378, 66, p. 5-10, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *et al.* *Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Editora Varela, 2007. 552p.

SILVA, R. A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B. *et al.* Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M. *et al.* Aspectos físico-químicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do Nordeste do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

TESHIMA, E.; VIANA, A. C.; ASSIS, M. M. S. *et al.* Identidade e qualidade do queijo de coalho comercializado em Feira de Santana. *Rev. Inst. Lat. Când. Tostes*, v. 59, n. 339, p. 194-198, 2004.

TIGRE, D. M.; BORELLY, M. A. N. Pesquisa de Estafilococos coagulase-positiva em amostras de “queijo coalho” comercializadas por ambulantes na praia de Itapuã (Salvador-BA). *Rev. Ciênc. Méd. e Biol.*, v.10, n.2, p.162-166, 2011.

VANETTI, M.C.D. Microrganismos patogênicos em leite. In: MENDONÇA, R.C.S. *Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo*. Viçosa, 2003. 209 p.

ZEGARRA, J. J. Q.; BOTTEON, R. C. C. M.; OLIVEIRA, B. C. R. S. *et al.* Pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Ciênc. An. Bras.*, v. 10, n. 1, p. 312-321, 2009.

Capítulo III

Identificação Molecular dos genes *FemA*, *Coa* e de enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de queijarias artesanais

O presente trabalho foi formatado de acordo com as normas da Revista CYTA Journal of Food- ISSN 1947-6337

**Identificação Molecular dos genes *FemA*, *Coa* e de enterotoxinas em
Staphylococcus aureus isolados de queijarias artesanais**

Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira^{a*}; Amanda Chagas da Silva^a; Vivianne Cambuí Figueiredo Rocha^b; Márcia Almeida de Melo^a; Maria das Graças Xavier de Carvalho^a

^aUnidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil. Avenida Universitária S/N - Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 - Patos/PB CEP:58708-110

[*suely.vet@hotmail.com](mailto:suely.vet@hotmail.com)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de aplicar a técnica de PCR no monitoramento da origem da contaminação bacteriana do queijo, por meio da detecção de *S. aureus* em amostras de leite cru, utensílios e mãos de manipuladores. Foram realizados PCR para genes de *femA*, *Coa* e produtores de enterotoxinas clássicas em 51 cepas de *Staphylococcus* spp. A amplificação do gene *femA* ocorreu em 40 amostras e para o gene *Coa*, apenas 20 amostras, cujos tamanhos variaram de 500 a 900 pb, indicando polimorfismo da região amplificada. As amostras sequenciadas revelaram uma similaridade entre 94 a 100% com sequências codificadoras do gene da estafilo-coagulase de *S. aureus*. Duas (3.9%) amostras foram positivas para os genes das enterotoxinas *sea*, *seb* e *sed*. Esse estudo nos permite reavaliar os procedimentos, a higiene do ambiente e do pessoal e podem contribuir para evitar ou diminuir a contaminação desse alimento por microrganismos causadores de intoxicação alimentar.

Palavras-chave: intoxicação alimentar, Gene coagulase, PCR, identificação molecular, sequenciamento.

ABSTRACT

The objective of this study was to apply the PCR technique in monitoring the origin of bacterial cheese contamination by *S. aureus* detection from raw milk, utensils and hands of manipulators. PCR were performed for gene *femA*, *Coa* and producers of classic enterotoxin in 51 strains of *Staphylococcus* spp. The *femA* gene amplification occurred in 40 samples and the *Coa* gene, only 20 samples whose sizes ranged 500-900 bp,

indicating polymorphism amplified region. The sequential samples showed a similarity between 94 to 100% with the coding sequences of staphylocoagulase gene of *S. aureus*. Two (3.9%) samples were positive for enterotoxin genes *sea*, *seb* and *sed*. This study allows us to re-evaluate the procedures, the hygiene of the environment and staff and can help to prevent or reduce contamination of this food for microorganisms that cause food poisoning.

Keywords: food poisoning, coagulase gen, PCR, molecular identification, sequencing.

Introdução

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo de coalho é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar, principalmente, por na maioria das vezes, serem elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, quanto para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos, entre elas a intoxicação estafilocócica aos consumidores (Andrade, Borges, Figueiredo, Machado & Porto, 2011; Feitosa, Borges, Nassu, Azevedo & Muniz, 2003).

Ao contaminar esses alimentos, *Staphylococcus*, quando presentes em concentrações elevadas e sob condições adequada de temperatura, pH e atividade de água produzem enterotoxinas nos alimentos (Borges, Nassu, Pereira, Andrade & Kuaye, 2008). Entre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais frequentemente associada a casos de surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (Omoe, Hu, Omoe, Nakane & Shinagawa, 2005). Essas enterotoxinas são termoestáveis e as clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, e *see*) são as principais responsáveis por surtos de intoxicações (Cremonesi et al., 2005). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Brasil, 2006) estabelece requisitos apenas para os estafilococos coagulase positiva, com valores máximos de até 10^3 UFC/g para queijos de média (36 a 46%) e alta umidade (46 a 55%).

Várias abordagens têm sido utilizadas para identificação do *S. aureus*, como por exemplo, a amplificação do gene *FemA*. Este gene codifica parte da estrutura da parede celular de *S. aureus*, desempenhando um importante papel na biossíntese de

peptidoglicano e faz parte dos genes *fem* (*femX*, *femB*, *femC*, e outros) os quais auxiliam na expressão gênica de resistência a meticilina (Benson et al., 2002).

Outro marcador molecular de identificação de *S. aureus* é o gene da coagulase. Esta molécula possui três regiões distintas: a região N-terminal (sítio de ligação à protrombina); uma região central (bastante conservada) e a região C-terminal (bastante variável, onde são encontradas de 4-8 sequências repetitivas de 27 aminoácidos) (Kanemitsu, Yamamoto, Takemura, Kaku & Shimada, 2001; Watanabe et al., 2005). A região gênica que corresponde a região C-terminal é constituída por seqüências curtas repetidas em *tandem* de 81 pb e permite subtipar isolados de *S. aureus* (Goh, Byrne & Zhang, 1992). O seu sequenciamento ou de sua porção 3' terminal tem sido um recurso utilizado para o estudo comparativo e de filogenia entre isolados de *S. aureus* (Watanabe et al., 2005).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de PCR para o rastreamento da origem da contaminação bacteriana do queijo, por meio da amplificação e sequenciamento do gene presente nas amostras de *S. aureus* provenientes de leite cru, utensílios e mãos de manipuladores.

Material e métodos

Coleta das amostras

As amostras de leite, queijos e utensílios foram colhidas em três queijarias artesanais, localizadas no Sertão paraibano. O estudo foi conduzido com três repetições, ou seja, três coletas em cada queijaria em dias diferentes, sendo as amostras identificadas com a letra A, B ou C, denominando a queijaria, seguida por um número que corresponde a coleta (1 para a primeira coleta, 2 para a segunda e três para a terceira), finalizando com uma letra relacionada ao tipo de amostra (L=leite, Q=queijo, Ma=mãos, Me= mesa, T=tanque e F=fôrma).

As amostras do tanque de fabricação, da mesa, da forma e das mãos do manipulador foram coletadas após a higienização e antes do início das atividades através da fricção de um swab estéril na área amostrada (equivalente a uma área de 10cm²) com pressão constante, em movimentos giratórios. A parte manuseada da haste do swab foi quebrada na boca interna do frasco contendo 9 mL de água peptonada 0.1% estéril (Silva et al., 2007).

As amostras de leite “in natura” foram coletadas utilizando-se frascos estéreis e as amostras de queijo foram coletadas na própria embalagem de fabricação. Todo o

material foi transportado em caixas isotérmicas contendo gelo até o laboratório de Tecnologia e Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Campina Grande, campus de Patos-PB.

As amostras foram diluídas em série com solução salina estéril, na proporção de 1/9, sendo 25g diluída em 225 mL de água peptonada a 0,1% para amostras sólidas ou 1 mL em 9 mL para amostras líquidas.

Para obtenção das colônias, as amostras foram semeadas em Ágar Baird Parker (BP) com gema de ovo e telurito de potássio a 3.5% e incubadas, em estufa a 37°C, por 24 - 48 horas. Foram selecionadas colônias típicas (negras, brilhantes e delimitadas por um halo opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio). As colônias típicas de cada placa foram inoculadas em tubos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion, HiMedia), na qual foram incubados a 37°C por 24 horas. A partir do subcultivo crescido em BHI, foram submetidas à análise de identificação das espécies com o auxílio do equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens) o qual é baseado na utilização de painéis (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimétricos de provas bioquímicas.

Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizada uma colônia crescida em Ágar Nutriente (HiMedia) a 35°C por 24 horas, e foi repicada em caldo BHI a 37° C por 20 horas. Após incubação, 1.0 mL da cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo o *pellet* no fundo do microtubo de 2 mL. Para a extração do DNA, foi utilizado o reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Brasil), seguindo-se a recomendação do fabricante.

Pesquisa do gene femA, Gene Coa e de enterotoxinas em cepas de Staphylococcus

As colônias foram submetidas à confirmação genotípica pela amplificação dos genes *femA* e *coa* e detecção das enterotoxinas clássicas (A, B, C, D e E). Os controles positivos utilizados foram: a cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) para o gene *femA* e *Coa*, *S. aureus* ATCC 13565 para o gene *sea*, ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*) da *American Type Culture Collection*. A sequência dos oligonucleotídeos pode ser observado na tabela 1.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 20 µL, contendo: 10X de tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM de KCl), 10µm de

dNTP, 1 μ m de cada *primer* (Invitrogen, Brasil), 1,5mM de MgCl₂, 2U da enzima Taq DNA polimerase (Ludwig) e 5 μ L do DNA bacteriano completando com 7.8 μ L de água ultrapura. Para o controle negativo, o DNA bacteriano foi substituído por água ultrapura.

Para amplificação do gene *coa*, as amostras foram submetidas a um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, pareamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final a 72°C por 10 minutos em termociclador (Biocycler, EUA). Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Blue Green Loading Die I, visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular (DNA *ladder* de 100 pb) para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

A termociclagem foi realizada sob as seguintes condições: ciclo inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e um ciclo final a 72°C por 5 minutos e aplicação no gel.

Purificação, sequenciamento e filogenia dos amplicons

A purificação do produto do PCR-*coa* foi realizada com kit comercial (Molecular Biology Kit, Ludwig), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos *primers* usados para a amplificações de PCR e foram encaminhadas para o Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A leitura foi realizada no sequenciador ABI 31001 (AB Applied Biosystems/HITACHI), composto de 16 capilares com comprimento de 50 cm. As sequências dos nucleotídeos foram analisadas pelo programa Mega 6.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, version 6.0) e comparadas com sequencias depositadas no GenBank. A árvore filogenética foi gerada usando o método estatístico Neighborjoining, com “bootstrap” de 1000 replicatas. As sequencias AB88507.1, TMUS2134, JCSC 7633, St-1125, MSSA476 e MW2 depositada no NCBI foram utilizadas como referência nos testes filogenéticos e a sequência *Macrocooccus caseolyticus* strain KH1504 foi utilizada como outgroup.

Números de acesso sequência de nucleótidos

As sequências de nucleotídeos do gene *Coa* e as sequências amplificadas neste estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank e receberam a identificação: KU639635 a KU639647.

Resultados

Foram obtidas 51 cepas de *Staphylococcus* spp., e através da bioquímica foram identificadas 16 colônias como *S. aureus*. Todas as amostras de *Staphylococcus* spp. foram submetidas a técnica de PCR para confirmação da presença do gene *femA* e *Coa*, onde houve amplificação do gene *femA* em 40 amostras, com *amplicons* característico de 132 pares de bases (pb), como pode ser observado na Figura 1.

Ao avaliar a presença de genes que codificam a produção de enterotoxinas, dentre as 51 amostras analisadas, apenas duas (3.9%) foram positivas, sendo que em uma amostra, proveniente do queijo de coalho, ocorreu coamplificação dos genes *sea* + *seb* e em outra amostra proveniente das mãos do manipulador, apenas para o gene *sed*, mostrado na Figura 3. Não houve amplificação para os genes *sec* e *see*.

Para o gene *Coa*, os isolados apresentaram amplificação em apenas 20 amostras, cujos tamanhos variaram de aproximadamente 500 a 900 pb. Esses resultados demonstram que a identificação dos isolados através das provas bioquímicas não foi confirmada pela PCR, havendo amplificação em mais quatro amostras de *S. aureus* que não foram encontradas na identificação bioquímica, o que reforça a importância da identificação ao nível molecular para a confirmação dos microrganismos.

Todas as amostras amplificadas para o gene *Coa* produziram uma banda única, com sequências que variaram de 500 a 900 pb, indicando a ocorrência de variações no número de unidades repetitivas de 81 pb, na região flanqueada pelos *primers*. A eletroforese de alguns amplicons obtidos pode ser observada na Figura 2. Os produtos de 700 pb foram os mais frequentes e representaram 50% dos positivos para o gene *coa*. A cepa utilizada como controle positivo amplificou um fragmento de aproximadamente 700 pb.

Através do tamanho das ampliações, foi possível observar que as cepas são estreitamente relacionadas, porém nem sempre idênticas. As amostras oriundas do queijo e do leite da queijaria B e o queijo da queijaria C apresentaram 100% de identidade. As demais amostras apresentaram mais diversidade, demonstrando a possibilidade de uma ampla disseminação desse microrganismo. Os resultados revelam

que há diferentes tipos de *S. aureus* e que os utensílios, mãos e leite não sejam as prováveis fontes de contaminação para os queijos.

Das 20 amostras que apresentaram amplificação na reação de PCR para o gene *Coa*, não foi possível obter um bom produto em 6 amostras. As demais sequências consenso foram submetidas ao BLAST, disponível no site do National Center for Biotechnology Information (NCBI - [www.ncbi.nlm.nih.gov / BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e a identidade foi entre 94 a 100% com sequências codificadoras do gene da estafilo-coagulase de *S. aureus* quando comparados com as sequências depositadas no GenBank. Essa identificação baseou-se na identidade e no menor valor E (E-value). Apenas uma amostra foi encontrada com 100% de identidade. A maioria foi agrupada com 99%, conforme demonstrado na Tabela 2.

Após o Blast, as sequências foram submetidas ao Programa Mega, a partir das quais foi construída uma árvore filogenética, onde se identificou que os 14 isolados eram filogeneticamente relacionados com a espécie *S. aureus*, apresentando altos valores de *bootstrap*. Além de confirmar a presença desses microrganismos nas amostras pesquisadas, foi possível observar o grau de similaridade entre elas. Esses resultados são visualizados através da árvore filogenética (Figura 4).

Discussão

Métodos moleculares têm sido crescentemente utilizados em diagnósticos microbiológicos em amostras de leite e derivados, com a finalidade de se obter resultados mais rápidos, seguros e específicos. A identificação de *S. aureus* através da amplificação do gene *femA* tem se mostrado útil em diversas pesquisas. Por muito tempo, o gene *femA* foi explorado como marcador específico de *S. aureus*, porém estudos relatam a presença desse gene em algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (Fernandéz, Marrero, Piqué, Castellanos & Gomis-ruth, 2004; Costa et al., 2012). Isso pôde ser constatado nesse estudo devido a presença desse gene em 40 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo que apenas 16 amostras foram identificadas bioquimicamente como *S. aureus*, demonstrando a sua presença em outras espécies.

Vannuffel et al. (1999), ao pesquisarem o gene *femA* nas espécies *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. saprophyticus*, provenientes de cepas padrões e isolados clínicos, chegaram à conclusão de que existe uma homologia do gene *femA* entre espécies coagulase negativa e o *S. aureus*, o que implica na amplificação do gene por PCR em várias espécies de estafilococos.

Chikkala, George, Ratnakar, Iyer & Sritharan (2012) evidenciaram que o gene *femA* não pode ser utilizado como um marcador confiável para *S. aureus*, pois o gene não foi amplificado em 70,4% de isolados de *S. aureus*. Os mesmos afirmam que variações (polimorfismos) nas sequências genômicas não são incomuns em espécies de estafilococos.

Os resultados de Dias et al. (2011) ao pesquisarem 200 amostras de leite obtidas de tanque de refrigeração de propriedades rurais em Sete Lagoas, MG, demonstraram que houve amplificação do referido gene em 145 amostras (72,5%). No estudo de Costa et al. (2012), foi utilizado o gene *femA* para identificação do *S. aureus*. No entanto, foi encontrada uma colônia coagulase negativa com expressão deste gene.

A amplificação do gene que codifica a proteína coagulase (*Coa*) tem sido relatada por diversos pesquisadores como método simples e acurado para identificar e discriminar *S. aureus*. Esse gene é polimórfico e possui repetições de 81pb permitindo a classificação de isolados (Silva & Silva, 2005). A detecção desse gene em amostras de leite pode ajudar a avaliar a segurança microbiológica do leite cru destinado ao uso direto na indústria de laticínios (Linage, Rodriguez-Calleja, Otero, Garcia-Lopez & Santos, 2012).

Gandra et al. (2005) afirmam que os primers *Coa*₂ e *Coa*₃ são específicos para *S. aureus*. Dos 55 isolados obtidos em seu estudo, houve apenas amplificação de DNA a partir de *S. aureus*, apresentando uma grande variação no tamanho do fragmento gerado, que pode ser o resultado de diferentes formas estruturais do gene que codificam para coagulase. Nas estirpes de *S. hyicus* e *S. intermedius* não houve amplificação do gene, podendo-se inferir que apesar de serem coagulase positiva, não expressam esse gene. Watanabe et al. (2009) relatam que apesar de terem atividade semelhantes ao coagular o soro, a coagulase produzida por *S. intermedius* apresentam sequência do gene *Coa* diferentes do *S. aureus*.

A enzima coagulase está presente em várias formas alélicas, o que faz com que os isolados possam ser classificados em diferentes variantes. O gene *Coa* possui a variabilidade da extremidade 3', com sequências curtas repetidas em tandem de 81 pb, que permitem diferenciar isolados de *S. aureus* pelo número das sequências repetidas (Goh et al., 1992). Isso tem sido usado como base para métodos de tipagem em isolados de fontes animais e humanas (Santos et al., 2003).

Vários estudos relatam essa variação, como dos realizados por Abbas, Khudor & Hanoon (2014), onde a amplificação do gene *Coa* em isolados a partir de secreções de

bovino (leite, swab vaginal e nasal) produziu cinco perfis diferentes, distribuídos de acordo com o tamanho do segmento amplificado. Silveira Filho et al., (2005) obtiveram a amplificação do gene *Coa* em 27 amostras de *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica e de equipamentos de ordenha, sendo que estes amplicons produziram dois perfis genotípicos.

Das cepas isoladas neste trabalho, a frequência de genes codificadores de enterotoxinas foi baixa quando comparadas aos 60% (*sea*), 37,9% (*seb*) e 6,9% (*sec*) encontrados por Dias et al, (2011) em amostras de leite. Morandi, Brasca, Lodi, Cremonesi & Castiglioni (2007) avaliaram 107 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de produtos lácteos e observaram presença dos genes em 67% dos isolados. Apenas a detecção dos genes toxigênicos em *S. aureus* não determina que estes isolados produzem enterotoxinas em um nível suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar ou outras doenças associadas às enterotoxinas (Chiang et al., 2008) uma vez que a produção das enterotoxinas também é influenciada por fatores do ambiente (pH, atividade de água, atmosfera, entre outros).

No entanto, os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos através da pesquisa realizada por Borelli et al. (2011), que ao analisarem estirpes de *Staphylococcus* isoladas de queijo Minas produzidos com leite cru, verificaram que nenhuma expressou as enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed*. Luz (2008) também encontrou baixa identificação dos genes no que se refere à presença das toxinas clássicas, pois dos 94 isolados de *S. aureus* de amostras de leite com mastite, nenhum apresentou os genes *sea*, *seb* e *sec*.

Embora os resultados discutidos possam diferir em sua grande maioria, deve-se refletir sobre a importância da genotipagem de amostras de *S. aureus* para um melhor diagnóstico da intoxicação alimentar. De acordo com Sá, Cunha, Elias, Victória & Langoni (2004), as variações observadas na distribuição dos genes toxigênicos nesse e em outros estudos realizados podem estar relacionadas às diferenças geográficas, devido a diferentes condições ambientais, bem como à natureza dos isolados de *S. aureus*.

Diversas pesquisas sobre sequenciamento de *S. aureus* são utilizados como ferramenta para estudos filogenéticos. Neste trabalho, o sequenciamento do gene da coagulase (*Coa*) mostrou-se bastante eficiente para identificação dos isolados.

O estudo de Silveira Filho et al. (2005) obtiveram como resultado diversos perfis genotípicos de *S. aureus* mostrando semelhança entre os isolados de queijos e de equipamento de ordenha, evidenciando o risco de veiculação desse microrganismo aos

consumidores de leite e derivados, devido a falta de higienização na ordenha. Nosso resultado também foi semelhante a pesquisa desenvolvida por Chapaval, Moon, Gomes, Duarte & Tsai (2006), onde também foi demonstrada grande similaridade entre as amostras de *S. aureus* isoladas de fontes humana, animal e maquinário, presumindo que a origem dessa contaminação seja o leite cru e a falta ou ineficácia de higienização de mãos e utensílios.

S. aureus, por ser uma bactéria contagiosa, pode ser transmitida durante todo o processamento de alimentos, seja por via nasal, garganta, equipamentos, pele entre outros, o que justifica o grau de similaridade entre as amostras analisadas. Olivindo et al. (2009), destacaram que as mãos de manipuladores agem como iniciadores da contaminação por essa bactéria.

Este estudo mostrou que a identificação genotípica de *Staphylococcus* spp. pode ser feita pela amplificação do gene *femA* e, dentre os isolados avaliados, o *S. aureus* foi confirmado pela amplificação do gene *Coa*, com apresentação de grande polimorfismo genético. A identificação do gene para enterotoxinas mostrou-se útil para avaliar um possível perfil dos *S. aureus*, embora os isolados tenham apresentado baixo potencial enterotoxigênico, a presença dos mesmos representa um risco potencial para a saúde pública.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de PCR para o rastreamento da origem da contaminação bacteriana do queijo, por meio da amplificação e sequenciamento do gene presente nas amostras de *S. aureus* provenientes de leite cru, utensílios e mãos de manipuladores.

Conclusão

Por meio da técnica de PCR conseguimos detectar a presença de *S. aureus* e as enterotoxinas no queijo, como também no leite, mãos e utensílios, fazendo um rastreamento da origem da contaminação nas amostras analisadas. Além disso, concluiu-se também que há uma grande similaridade genética entre os isolados de *S. aureus* encontrados nas amostras analisadas e que a técnica de sequenciamento genético mostrou ser útil para apontar os possíveis pontos de contaminação bacteriana.

Os conhecimentos obtidos nesse estudo nos permite reavaliar os procedimentos, a higiene do ambiente e do pessoal e podem contribuir para evitar ou diminuir a contaminação desse alimento por microrganismos causadores de intoxicação alimentar.

Referências bibliográficas

Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. (1995). Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Can J Vet Res.* 59. p 124–128.

Abbas, B. A., Khudor, M. H., & Hanoon, B. M. (2014). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine and the detection of its coagulase gene (coa) using polymerase chain reaction (PCR). *Scientific Research and Essays.* v. 9(20), p. 864-868. doi: 10.5897/SRE2014.6029

Andrade, A. P. C., Borges, M. F., Figueiredo, E. A. T., Machado, T. F., & Porto, B. C. (2001). Perfil de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Negativa contaminantes de queijo de coalho. *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*, p18. Retrieved from http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=353

Bayles K.W., Iandolo J.J. (1989). Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*, 171, 4799-4806.

Benson, T.E., Prince, D. B., Mutchler, V. T., Curry, K. A., Ho, A. M., Sarver, R. W., Hegadorn, J. C., Choi, G. H., & Garlick, R. L. (2002). Structure of *Staphylococcus aureus femA*. *Structure*, v. 10, n. 8, p. 1107-1115. doi: S0969-2126(02)00807-9

Berger-bachi, B.; Barberismaino, L.; Strassle, A.; Kayser, F. H. (1989). FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Molecular and General Genetics*, v. 219, n. 1-2, p. 263-269.

Betley M.J., Mekalanos J.J. (1988). Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, 170, 34-41.

Borelli, B. M., Lacerda, I. C. A., Brandão, L. R., Vianna, C. R., Ferreira, M. C., Gomes, F. C. O., Carmo, L. S., Heneine, L. G. D., & Rosa, C. A. (2011). Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.2, p.481-487. doi: 10.1590/S0102-09352011000200028

Borges, M. F., Nassu, R. T., Pereira, J. L., Andrade, A. P. C., & Kuaye, A. Y. (2008). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de Coalho. *Ciência Rural*, v.38, n.5, p. 1431-1438. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n5/a37v38n5.pdf>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996, Seção 1, p.3977-3978. Retrieved from <http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=669>

Bystroń J., Molenda J., Bania J., Kosek-Paszkowska K., Czerw M. (2005). Occurrence of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in raw poultry meat Pol. *J Vet Sci*, 8, 37-40.

Chapaval, L., Moon, D.H., Gomes, J.E., Duarte, F.R., & Tsai, S.M. (2006). Use of pcr to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (tst) in *staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq. Inst. Biol*, v. 73, p. 165-169. Retrieved from <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/855695>

Chiang, Y-C., Liao, W-W., Fan, C-M., Pai, W-Y., Chiou, C-S., & Tsen, H-Y., (2008). PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 121, 66-73. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.011

Chikkala, R., George, N. O., Ratnakar, K. S., Iyer, R. N., & Sritharan, V. (2012). Heterogeneity in *femA* in the India isolates of *Staphylococcus aureus* limits its usefulness as a species specific marker. *Adv. Infect. Dis.* n. 2, p. 82-88. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4236/aid.2012.23013>

Costa, J. C. B., Freitas, E. I., Lemos, A. A., Rosas, C. O., Medeiros, V. M., Warnken, M. B., & Miyazaki, N. H. T. (2012). Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes. *Rev Inst Adolfo Lutz*, v. 2, n. 71, p. 250 – 258. Retrieved from <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/8867>

Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramente, G., Moroni, P., & Castiglioni, B. (2005). Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, v. 19 p. 299-305. doi: doi:10.1016/j.mcp.2005.03.002

Dias, N. L., Silva, D. C. B., Oliveira, D. C. B. S., Fonseca Júnior, A. A., Sales, M. L., & Silva, N. (2011). Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1547-1552. doi: S0102-09352011000600036

Feitosa, T., Borges, M. F., Nassu, R. T., Azevedo, E. H. F., & Muniz, C. R. (2003). Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 162-165. doi: S0101-20612003000400030

Fernandéz, G. M., Marrero, A., Piqué, S. G., Castellanos, R. G., & Gomis-Ruth, F. X. (2004). Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. *FEMS Microbiology Letters*. v. 235, n. 1, p. 1-8. doi: [doi:10.1016/j.femsle.2004.04.035](http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.035)

Gandra, E. A.; Silva, J. A.; Macedo, M. R. P.; Araújo, M. R.; Mata, M. M.; Silva, W. P. (2005). Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 2, p. 99-103. Retrieved from <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewArticle/306>

Goh, S., Byrne, S.K., Zhang, J.L., & Chow, A. W. (1992). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 7, p. 1642-1645. doi: 0095-1137/92/071642-04\$02.00/0

Linage, B., Rodriguez-Calleja, J. M., Otero, A., Garcia-Lopez, M. L., & Santos, J. A. (2012). Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. *J. Dairy Sci.* 95 (4), p. 1639-1644. doi: [doi:10.3168/jds.2011-4734](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4734)

LUZ, I. S. (2008). *Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco*. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública). Retrieved from <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/3952>

Kanemitsu, K., Yamamoto, H., Takemura, H., Kaku, M., & Shimada, J. (2001). Relatedness between the coagulase gene 3'- end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol and Immun*, v. 45, n. 1, p. 23-27. doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb01270.x

Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., & Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiology*. v. 124 (1-2), n. 20, p. 66 – 72. doi: [10.1016/j.vetmic.2007.03.014](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.014)

Olivindo, C. S., Chapaval, L., Vilarroel, A. B. S., Alves, F. S. F., Sousa, F. G. C., & Fernandes, E. P. (2009). Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.7, p.1317-1321. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Lea_Chapaval/publication/262521589_Detection_of_Staphylococcus_aureus_using_the_REP-PCR_technique_to_monitor_goat_milk_quality/links/55b39eaa08ae092e96539dc8.pdf

Omoe, K., Hu, D., Omoe, H. T., Nakane, A., & Shinagawa, K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, v. 246, p. 191-198. doi: [doi:10.1016/j.femsle.2005.04.007](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.007)

Rosec, J. P.; Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 77, p. 61-70, 2002.

Sá, M. E. P., Cunha, M. S. R. S., Elias, A. O., Victória, C., & Langoni, H. (2004). Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, p.321-326. doi: 10.1590/S1413-95962004000500005

Santos, F.G.B., Mota, R.A., Silveira Filho, V.M., Souza, H.M., Oliveira, M.B.M., Johner, J.M.Q., Leal, N.A., Almeida, A.M.P., & Leal-Balbino, T.C. (2003). Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Revista Napgama*, v. 6, p. 19-23. Retrieved from <http://157.86.8.70:8080/certifica/handle/icict/6254>

Silva.; E. R., & Silva, N. (2005). Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 69, p. 260-264. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1250237/>

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. *et al.* (2007). Manual de Métodos de Análises Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Editora Varela, 552p.

Silveira Filho, V. M.; Freitas, M. F. L.; Luz, I. S.; Almeida, A. M. P.; Leal, N. C.; Sena, M. J.; Mota, R. A.; Leal-Balbino, T. C. (2005). Estudo Epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina provenientes do Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Napgama*, v. 8, n. 1, p. 12- 17. Retrieved from <http://157.86.8.70:8080/certifica/handle/icict/6673>

Vannuffel, P., Heusterspreute, M., Bouyer, M., Vandercam, B., Philippe, M., & Gala, J. L. (1999). Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Res Microbiol. n. 150*, p.129-141. doi: [doi:10.1016/S0923-2508\(99\)80030-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80030-8)

Watanabe, S., Ito, T., Takeuchi, F., Endo, M., Okuno, E., & Hiramatsu, K. (2005). Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, v. 187, n.11, p. 3698-3707. doi: 10.1128/JB.187.11.3698-3707.2005

Watanabe, S.; Ito, T.; Sasaki, T.; Li, S.; Uchiyama, I.; Kishii, K.; Kikuchi, K.; Skov, R. L.; Hiramatsu, K. (2009). Genetic Diversity of Staphylocoagulase Genes (*coa*): Insight into the Evolution of Variable Chromosomal Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, v. 4, n. 5, p. 1 – 11. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005714>

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a amplificação de gene das espécies de *Staphylococcus* e detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

Oligonucleotídeos (5'–3')	Gene alvo	Produto Amplificado	Referências
SEA1: ACGATCAATTTTACAGC SEA2: TGCATGTTTTCAGAGTTAATC	<i>sea</i>	544 bp	Rosec & Gigaud, 2002
SEB1: GAATGATATTAATTCGCATC SEB2: TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	<i>seb</i>	416 bp	Rosec & Gigaud, 2002.
SEC1: GACATAAAAGCTAGGAATTT SEC2: AAATCGGATTAACATTATCCA	<i>sec</i>	257 bp	Betley et al., 1988.
SED1: TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT SED2: CCACCATAACAATTAATGC	<i>sed</i>	334 bp	Bayles et al., 1989.
SEE1: ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA SEE2: TAACTTACCGTGGACCC	<i>see</i>	170 bp	Bystron et al., 2005.
FEMA1: AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG FEMA2: GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG	<i>femA</i>	132 bp	Berger-Bachi et al., 1989.
COAG2: ACCACAAGGTACTGAATCAACG COAG3: TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC	<i>CoaG2</i> <i>CoaG3</i>	variavel	Aarestrup et al., 1995.



Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene *femA*.

Nota: M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (*S. aureus* ATCC 25923); CN: Controle Negativo; Canaletas 1-6: amostras positivas.



Figura 2- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da coagulase (*Coa*). Nota: M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (*S. aureus* ATCC 25923); CN: Controle Negativo; Caneletas 1-5, 8 e 9 Negativas; Caneletas 6, 7 e 10 com diferentes padrões de amplicons.

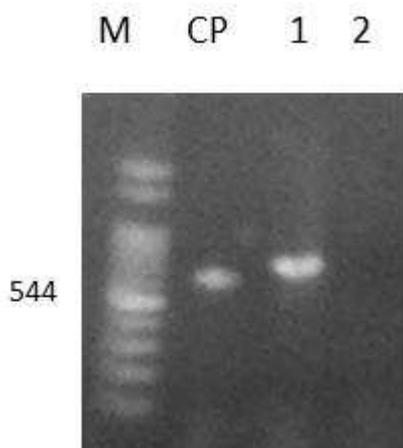


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da enterotoxina (*Sea*). Nota: M: Marcador de peso molecular (100 pb DNA ladder); CP: Controle Positivo (*S. aureus* ATCC 14458); Caneleta 1: Positivo para o gene sea; Caneleta 2: amostra negativa.

Tabela 2: Resultados do alinhamento local das sequências do gene *Coa* de *S. aureus*. As sequências foram comparadas aquelas depositadas no National Center for Biotechnology Information, utilizando o Blast.

Isolado	Espécie/Linhagem	Tamanho da sequência	ID (%)	Query cover
A1Q	<i>Staphylococcus aureus</i> DNA, complete genome, strain: FDA209P	865	99	100
A1L	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>coa</i> gene for staphylocoagulase, complete cds, strain: IFH514	551	96	100
A1Ma	<i>Staphylococcus aureus</i> DNA, complete genome, strain: FDA209P	954	99	100
A1T	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain GR2, complete genome	703	94	100
A2F	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>coa</i> genes for hypothetical proteins	740	96	100
A3Ma	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	693	100	100
B1Q	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	737	99	100
B2L	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	737	99	100
B3Q	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	691	99	100
C1Ma	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>coa</i> genes for hypothetical proteins	820	99	98
C1T	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>coa</i> genes for hypothetical proteins	688	98	100
C2Q	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	737	99	99
C2L	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	716	99	100
C2Ma	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 DNA, complete genome	708	99	100

ID: identidade

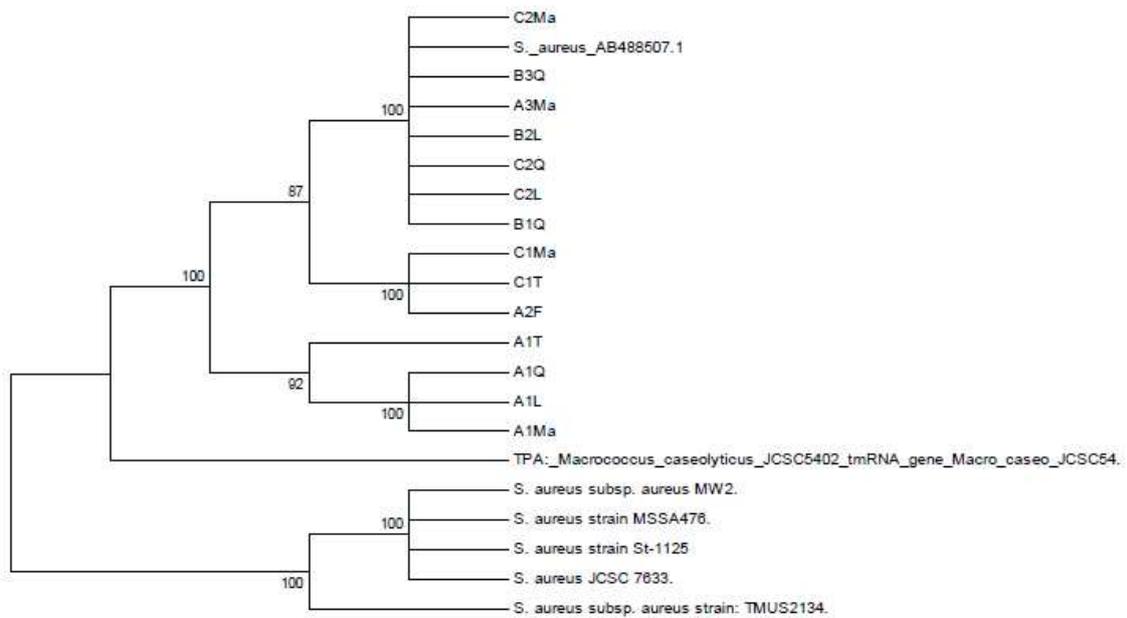


Figura 4: Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do gene da coagulase de 14 amostras de *S. aureus* isoladas de leite, queijo, swabs de mãos, tanque, mesa e fôrma de queijo de três queijarias artesanais da Paraíba, utilizando-se o método de neighbor-joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, as queijarias foram avaliadas quanto as condições higiênico-sanitárias através do *checklist* das Boas Práticas de Fabricação e foram identificados os principais pontos de contaminação na produção de queijo de coalho, além de se reallizar a identificação por técnica molecular dos *Staphylococcus* sp isolados de amostras colhidas nos estabelecimentos. Os resultados observados permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Do ponto de vista das Boas Práticas e segurança alimentar, a maioria das queijarias avaliadas apresentaram muitos problemas que comprometem a qualidade dos produtos e, conseqüentemente, a saúde dos consumidores;
- O nível de contaminação por coliformes totais, termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus* spp. do leite cru recebido pelas queijarias mostrou-se elevado, apresentando-se como o principal foco de contaminação dos utensílios, equipamentos e mãos dos manipuladores.
- As condições higiênico-sanitárias dos utensílios, equipamentos e mãos de manipuladores também encontravam-se inadequadas, contribuindo desta forma, na permanência e propagação desses microrganismos no interior das queijarias.
- A identificação genotípica (PCR) de *Staphylococcus* spp. pode ser feita pela amplificação do gene *femA* e, dentre os isolados avaliados, o *S. aureus* foi confirmado pela amplificação do gene *Coa*, com apresentação de grande polimorfismo genético.
- Os genes *sea*, *seb* e *sed*, codificadores de enterotoxinas, ocorrem em espécies de *S. aureus* isolados em amostras de queijo e mãos de manipuladores;
- O sequenciamento genético mostrou ser útil para investigar os possíveis pontos de contaminação bacteriana, assim como as falhas na fabricação de produtos artesanais, como é o caso do queijo de coalho.
- Os conhecimentos obtidos nesse estudo nos permite reavaliar os procedimentos, a higiene do ambiente e do pessoal e podem contribuir para evitar ou diminuir a contaminação desse alimento por microrganismos causadores de intoxicação alimentar.