



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
Departamento de Tecnologia de Alimentos



**DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO SERRA  
DA CANASTRA E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO  
*ENTEROCOCCUS***

**CLEBER ROGERES DE ANDRADE**

Biólogo e Farmacêutico

**ARNALDO YOSHITERU KUAYE**

Orientador

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos**

Campinas-SP

2009

A24d	<p>ANDRADE, Cleber Rogeres.          Diagnóstico da qualidade microbiológica de queijo serra da canastra e caracterização de bactérias do gênero enterococcus. / Cleber Rogeres de Andrade. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.</p>
	<p>Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye.          Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p>
	<p>1. Queijo - Serra da Canastra (MG). 2. Enterococcus. 3. Segurança de alimentos. 4. Resistencia. 5. Antimicrobianos. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p style="text-align: right;">cars/bibfea</p>

Título em inglês: Quality of microbiologic diagnosys of the canastra's serra cheese and characterization of bacteria of the genre enterococcus

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Canastra's serra cheese . 2. Enterococcus. 3. Sasety of food. 4. Resistance. 5. Antimicrobials.

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Mirna Lucia Gigante

Ernani Porto

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

# **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
(Orientador)**

---

**Prof. Dr. Mirna Lucia Gigante  
(Membro)**

---

**Prof. Dr. Ernani Porto  
(Membro)**

---

**Prof. Dr. Jose Luiz Pereira  
(Membro)**

---

**Dr. Maristela da Silva do Nascimento  
(Membro)**

**A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltara ao seu tamanho original**

**ALBERT-EINSTEIN**

**DEDICO ESTA VITÓRIA**

**Aos meus queridos filhos, Cahel Filipe Vieira de Andrade e  
Bruna Vieira de Andrade, e a minha amada esposa,  
Darlene Silva Vieira de Andrade , companheira de todos os  
momentos.**

## **Agradecimentos**

A Deus pela presença constante em minha vida;

A minha família, esposa e filhos pelo apoio;

Ao Prof. Dr Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, disponibilidade e oportunidade;

A Dirce Yorika Kabuki, técnica do laboratório de Higiene pela disponibilidade, apoio e colaboração na realização deste trabalho;

A amiga e companheira de laboratório Celina Mara Soares pelo trabalho em conjunto;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho.

# SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1Objetivo Geral .....	19
2.2Objetivos específicos .....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1Queijo Canastra e Padrão de Qualidade .....	20
3.2Queijos e saúde pública.....	23
3.3Microorganismos patogênicos em queijo.....	26
3.3.1 Coliformes termotolerantes .....	26
3.3.2 Estafilococos coagulase positiva e negativa .....	27
3.3.3 <i>Salmonella</i> spp.....	28
3.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
3.3.5 <i>Bacillus cereus</i> .....	29
3.4Bactérias ácido-láticas em queijos artesanais.....	30
3.5Atividades antimicrobianas de bactérias ácido-láticas .....	31
3.5.1 Classificação e modo de ação das bacteriocinas.....	33
3.5.2 <i>Enterococcus</i> e antagonismo frente à patógenos em alimentos	36
3.5.3 Os fatores de virulência.....	38
3.5.4 Resistência a antimicrobianos.....	40
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1Amostras .....	40
4.2Análises Microbiológicas.....	41
4.2.1 Determinação de coliformes termotolerantes.....	41
4.2.2 Determinação de estafilococos coagulase positiva .....	41
4.2.3 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	41
4.2.4 Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	42
4.2.5 Determinação de <i>Bacillus cereus</i> .....	42
4.2.6 Contagem de bactérias do Gênero Enterococos .....	43
<b>4.2.6.1Identificação de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus</i></b>	
<b><i>faecalis</i> através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR....</b>	<b>44</b>
4.2.6.1.1Extração de DNA.....	44
4.2.6.1.2Reação de polimerização em cadeia – PCR .....	44
4.2.7 Avaliação da produção de gelatinase e atividade hemolítica .....	45
4.2.8 Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	45
4.2.9 Determinação de atividade antimicrobiana .....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de queijo Serra da	
Canastra .....	50
5.2Avaliação de bactérias do gênero <i>Enterococcus</i> .....	53
5.3Avaliação de fatores de virulência.....	56
5.4Sensibilidade a antimicrobianos .....	58
5.5..... Avaliação da atividade antimicrobiana frente à patógenos isolados de	
alimentos.....	62
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>66</b>

# LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação das bacteriocinas segundo Drider et al.,(2006).....	34
<b>Tabela 2:</b> <i>Primers</i> e condições de anelamento utilizados na PCR de isolados de enterococos para os genes <i>ddlE. faecium</i> e <i>ddlE. faecalis</i> .....	45
<b>Tabela 3:</b> Padrão de interpretação dos diâmetros dos halos de identificação de inibição do crescimento de <i>Enterococcus spp.</i> .....	46
<b>Tabela 4:</b> Descrição e condições de desenvolvimento dos microrganismos patogênicos.....	48
<b>Tabela 5:</b> Adequação das amostras do queijo Serra da Canastra com os padrões legais da RDC 12/01da ANVISA.....	50
<b>Tabela 6:</b> Distribuição das amostras em função das faixas de variação das contagens de colônias presuntivas de Enterococos.....	53
<b>Tabela 7:</b> Resultados de testes bioquímicos para confirmação de gênero <i>Enterococcus</i> e identificação de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> através da PCR.....	56
<b>Tabela 8:</b> Análise fenotípica de fatores de virulência de isolados * de enterococos de amostras de queijo Serra da Canastra.....	58
<b>Tabela 9:</b> Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de difusão em ágar de isolados de <i>Enterococcus</i> * obtidos de amostras de queijo Serra da Canastra.....	59
<b>Tabela 10:</b> Perfil de resistência a antimicrobianos apresentado por <i>Enterococcus faecium</i> obtidos de amostras de queijo Serra da Canastra.....	60
<b>Tabela 11:</b> Espectro antimicrobiano de <i>Enterococcus faecium</i> isolados do queijo Serra da Canastra frente a patógenos.....	62

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécie. Canaleta 7: marcador molecular (100 pb); 1 a 6: *E. faecalis* ATCC 29212 positivo para o gene *ddl* *E. faecalis* (941 pb).....46

**Figura 2:** Gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécie. Canaleta 4: marcador molecular (100 pb); 1 a 3: *E. faecium* isolados de amostras de queijo positivos para o gene *ddl* *E. faecium* (550 pb); 5: *E. faecium* ATCC 6569 positivo para o gene *ddl* *E. faecium* (550 pb).....46

## APÊNDICE A

**Tabela A.1:** Avaliação microbiológica do queijo Serra da Canastra segundo os padrões da RDC 12/01 ANVISA ..... 98

## APÊNDICE B

**Tabela B.1:** Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 1 a 31 das amostras de queijo Serra da Canastra.....99

**Tabela B.2:** Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 36 a 63 das amostras de queijo Serra da Canastra .....100

**Tabela B.3:** Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 64 a 99 das amostras de queijo Serra da Canastra .....101

**Tabela B.4:** Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 100 a 135 das amostras de queijo Serra da Canastra .....102

**Tabela B.5:** Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 137 a 181 das amostras de queijo Serra da Canastra.....103

## APÊNDICE C

**Tabela C.1:** Resultados das análises fenotípicas dos isolados presuntivos de *Enterococcus* de número 1 a 121 do queijo Será da Canastra .....104

**Tabela C.2:** Resultados das análises fenotípicas dos isolados presuntivos de *Enterococcus* de número 122 a 181 do queijo Será da Canastra .....106

## APÊNDICE D

**Tabela D.1:** Espectro antimicrobiano de *Enterococcus faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *L. monocytogenes* .....107

**Tabela D.2:** Espectro antimicrobiano de *E. faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *Bacillus cereus* .....108

**Tabela D.3:** Espectro antimicrobiano *E. faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *Staphylococcus aureus* .....110

## RESUMO

O queijo Serra da Canastra é fabricado a dezenas de anos de maneira empírica e tradicional. Devido a produção artesanal a partir de leite cru, este tipo de queijo é preocupante do ponto de vista de saúde pública, pois pode ser uma importante via de transmissão de microrganismos patogênicos. No processamento emprega-se o “pingo”, um fermento natural obtido durante a etapa de salga do queijo. Em alguns tipos de queijos artesanais, *Enterococcus* é apontado como o gênero predominante. Estudos mostram que as enterocinas produzidas a partir destas bactérias possuem alta especificidade contra vários microrganismos, entre eles a *Listeria spp.* Entretanto, a atuação de espécies de enterococos como agente etiológico de infecção humanas também é conhecida. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a adequação de amostras de queijo Minas Serra da Canastra comercializados em estabelecimentos varejista na cidade de Araras-SP, a padrões de qualidade; isolar e identificar espécies de enterococos provenientes das amostras; avaliar o espectro de atividade antimicrobiana dos isolados frente a linhagens de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e avaliar a ocorrência de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos dos isolados e identificados como *Enterococcus*. Foram analisados vinte e sete amostras de queijo Serra da Canastra, para determinação de: Coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, conforme – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, acrescido da determinação de *B. cereus*. Para coliformes termotolerantes 70,4% (19/27) das amostras apresentaram valores detectáveis (<3 NMP/g), 29,6% (8/27) continham valores entre 7 e 210 NMP/g - valores estes dentro dos limites ( $5 \times 10^3$ ), legais (ANVISA, 2001). A ocorrência de estafilococos coagulase positiva foi observada em 22,2% (6) das amostras analisadas, com contagens variando de  $1,5 \times 10^1$  a  $2,1 \times 10^3$ , das quais 7,40% (2) com valores acima do limite estabelecido pela legislação ( $10^3$  UFC/g). *B. cereus* foi detectado em 11,1% (3) das amostras com contagens entre  $1,5 \times 10^2$  a  $2,0 \times 10^2$  UFC/g. Não foi verificada a presença de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas. Cento e quarenta e sete isolados (121 *Enterococcus faecium* identificados por PCR e 26 isolados presuntivos através de provas bioquímicas) foram pesquisados quanto à presença de fatores de virulência, através de provas fenotípicas (gelatinase e hemólise), sendo encontrados resultados positivos para apenas dois isolados a prova de gelatinase. A sensibilidade a antimicrobianos foi testada utilizando o método de disco-difusão em ágar e 21,5% dos isolados identificados como *E. faecium* apresentaram resistência a quatro, cinco, seis ou sete dos antimicrobianos testados (vancomicina, gentamicina, clorofenical, eritromicina, ampicilina, teicoplanina e tetraciclina). Dentre os antibióticos testados, a maior frequência (38,8%) de resistência foi observada frente ao teste de sensibilidade a tetraciclina. No teste de sensibilidade a vancomicina, 29,4% dos isolados analisados apresentaram resistência. Cinquenta e seis isolados de *E. faecium* identificados por PCR,

selecionados, foram testados para determinação do espectro de atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. aureus*. Nenhum dos isolados testados (100%) ocasionaram a formação de halo de inibição.

## SUMMARY

The Canastra's cheese is developed for decades in a traditional and empirical way. Such product is crafted from raw milk in the farm. The use of the raw milk for the development of this kind of cheese is worrying because this could be an important vessel of transmission of many pathogens. The traditional cheese made in the farm utilizes the "pingo", a natural ferment obtained during the step of cheese's salting. In some kinds of crafted cheese, *Enterococcus* is pointed as the predominant. Studies shows that the enterocines produced from those bacteria have high specificity against various microorganisms, among them the *Listeria* spp. However, the performance of species of *Enterococcus* like etiologic agent of humans infections is know. The objective of the recent study was evaluate the adequacy of samples of Serra da Canastra's cheese marketed in establishments and retailers in the city of Araras-SP, in patterns of quality, isolate and identify species of *Enterococcus* from samples through PCR, evaluate the spectrum of antimicrobial activities of isolate on the *Listeria monocytogenes* lines, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, evaluate the occurrence of virulence factors and resistance to antimicrobials of isolated know as *Enterococcus*. Twenty seven samples of Serra da Canastra's cheese were analyzed for the determination of: thermotolerant coliforms, positive coagulase *Staphylococcus*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, according – RDC nº 12 of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária, plus the determinarion of *B. cereus*. In the determination of thermotolerant coliforms 70,37% (19/27) they show not detectable values ( $> 3$  NMP/g), being that 29,62% (8/27) had thermotolerant coliforms between 7 and 210 NMP/g, values that are under the limits ( $5 \times 10^3$ ), established by RDC nº 12/2001 (ANVISA, 200). Occurrence of positive coagulase staphylococi was observed in 22,22% (6) of the analyzed samples, with counts ranging  $1,5 \times 10^1$  to  $2,1 \times 10^3$ , of which 7,40% (2) with values above the limit established by law ( $10^3$  UFC/g). For certain values for *B. cereus*, there was that 11,11% (3) of the Canastra cheese samples showed counting between  $1,5 \times 10^2$  to  $2,0 \times 10^2$  UFC/g. It was not verified the presence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in the analyzed samples. One hundred forty-seven isolate (121 *Enterococcus faecium* identified by PCR and 26 presumptive isolate) were searched for the presence of virulence factors, through phenotypic tests (gelatinase and haemolysis). The sensitivity to antimicrobials was tested using the method of disk-diffusion in agar. Two isolates showed positive results for the galatinase test and none of the isolates produced hemolysis. As for the sensitivity profile to antimicrobials, 21,5% of the isolates identified as *E. faecium* showed resistance to 4,5,6 or 7 of the antimicrobials tested (vancomicine, gentaminice, clorofenical, eritrocimine, ampilicine, teicoplamine and tetracycline). Among the tested antibiotics, the highest frequency of resistance was observed from the test of sensibility to tetracycline, since 38,8% of the isolates showed resistance to those antimicrobials. In the sensibility test to vancomicine, 29,4% of the analyzed isolates showed resistance. Fifty-six isolates of *E. faecium* identified by PCR, selected were tested to the determination of the spectrum of the antimicrobial

activity front the microorganisms *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *S. aureus*.  
None of the isolates tested (100%) led to the formation of halo of inhibition.

# 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dentre os vários produtos derivados do leite, o queijo se destaca por ser o mais consumido, sendo que a produção Brasileira em 2003 foi aproximadamente 488.053 toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJO, 2004).

Estima-se que o agro artesanato mineiro represente uma economia da ordem dos sete bilhões de reais por ano, um número expressivo de famílias vive da produção e comercialização de queijo artesanal, sendo uma atividade tradicional de vários municípios e exerce grande importância para economia e identidade sócio-cultural do Estado de Minas Gerais, além de ser a principal atividade geradora de renda das famílias da região (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA, 1999).

O queijo Minas da Serra da Canastra é fabricado de maneira empírica e tradicional, produzido artesanalmente a partir de leite cru, na própria fazenda, sem qualquer acompanhamento tecnológico (VARGAS et al., 1998).

Como não existe padronização no processo de fabricação quanto ao tempo de coagulação, tipo de coalho utilizado, prensagem, salga e teor de umidade do produto final, pode-se encontrar no mercado, uma variedade de queijos Canastra que não obedecem a qualquer padrão de identidade e qualidade (BORELLI, 2002).

A utilização de leite cru para fabricação deste tipo de queijo é preocupante, pois este pode ser uma importante via de transmissão de inúmeros patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, dentre outros (BINTSIS, 1995). Estima-se que todos os anos centenas de milhões de pessoas no mundo adoeçam através do consumo de alimentos contaminados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997), sendo os produtos lácteos dentre os principais envolvidos (De BUYSER et al., 2001).

O queijo tradicional feito na fazenda emprega o “pingo”, um fermento natural obtido durante a etapa de salga do queijo no final da produção, com auxílio de um coletor disposto logo abaixo do furo existente na porção inclinada da bancada, que recolhe o soro, fermento natural que será utilizado no dia seguinte. Este fermento natural (“pingo”) usado na produção é composto por

espécies de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, (BORELLI, 2006b, NÓBREGA, 2007).

Como na região da Serra da Canastra não há comercialização legal do produto, 100% da produção é entregue a figura do “queijeiro” geralmente antes de completarem uma semana de cura a temperatura ambiente. Este atravessador vai até as fazendas buscar o queijo, promovendo o seu transporte, das fazendas para seus depósitos, dentro de sacos plásticos, a granel ou em caixas plásticas em carrocerias de caminhão, simplesmente cobertos com lona, o que poderá ocasionar um aumento da contaminação e degradação da qualidade (BORELLI, 2002).

Em 2001 o Ministério Público do Estado de Minas Gerais, chegou a interditar a comercialização do queijo artesanal, baseado no aumento das exigências do consumidor relacionado à segurança alimentar. Porém, através da mobilização dos produtores e apoio de diversas entidades públicas e privadas a decisão foi temporariamente revogada. Como consequência deste movimento, foi elaborada e regulamentada no ano de 2002, a legislação estadual específica para o queijo de fazenda fabricado com leite cru, que difere da lei federal vigente (Portaria 14/96 – MAARA), por não exigir a passagem obrigatória do produto por entreposto inspecionado e o tempo de maturação mínima de 60 dias.

Em relação à fabricação do queijo Minas artesanal, a legislação pertinente abrange: Lei Estadual (MG) n° 14.185, de 31 de Janeiro 2002; Decreto (MG) n° 42.645, de 5 de Junho de 2002 (IMA), que dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo Minas artesanal.

Diversos trabalhos científicos publicados no Brasil têm revelado a baixa qualidade microbiológica dos queijos comercializados, caracterizados pela freqüente contaminação por coliformes termotolerantes e *S. aureus* em produtos artesanais (EUTHIER, 1998; PEREIRA, 1999; LOGUERCIO, 2001; SALOTTI, 2006; BORELLI et al., 2006b; NÓBREGA, 2007; PEREIRA, 2008).

A presença de microrganismos como coliformes termotolerantes e *S. aureus* no queijo Minas artesanal da Serra da Canastra relatado em pesquisas, pode estar associado à utilização de leite cru e as práticas de produção. Porém, esta contaminação do produto final pode ser agravada devido ao

transporte e armazenamento incorreto, a inexistência de embalagens ou o uso de embalagens inadequadas que não garantem a integridade do produto.

O consumo de alimentos formulados com conservantes naturais tem recebido maior interesse do consumidor, bem como, alimentos naturais e minimamente processados. Como resultado, há um maior interesse nos agentes antimicrobianos produzidos naturalmente. Devido aos elevados gastos com doenças relacionadas ao consumo de alimentos por microrganismos patogênicos, os alimentos “seguros” têm recebido crescente interesse (YANG e RAY, 1994; CLEVELAND et al., 2001).

Conservantes químicos artificiais geralmente são empregados para limitar o número de microrganismos capazes de crescer nos alimentos, mas a atenção dos consumidores tem sido voltada aos riscos à saúde associados a algumas destas substâncias, o que tem incentivado pesquisadores a examinar a possibilidade do uso de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como biopreservativos (DE VUYST e VANDAME, 1994; ABEE, 1995; HOLZAPFEL et al., 1995).

O leite cru constitui boa fonte de bactérias ácido-láticas passíveis de serem utilizadas pela indústria laticinista nacional, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima. A capacidade de produzir ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas entre outros, é o que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas (ALEXANDRE, 2002).

Bacteriocinas e bactérias produtoras de bacteriocinas têm sido empregadas como recurso tecnológico na produção de certos tipos de alimentos, com o objetivo de controlar o desenvolvimento de microrganismo patogênicos e/ou microrganismos deteriorantes nesses produtos. Por serem as bacteriocinas consideradas conservantes “naturais”, seu emprego em alimentos é muito promissor (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas produzidas por bactérias que podem eliminar bactérias ou inibir o crescimento de outras. Muitas bactérias lácticas produzem uma grande diversidade de bacteriocinas, estas inibem uma faixa limitada de microrganismos patogênicos e esporulados e, por essa razão, são potencialmente úteis como preservativos em alimento (CLEVELAND et al., 2001).

Bactérias lácticas são cocos ou bastonetes, Gram-positivos, fermentadoras, produtoras de ácido láctico, e apresentam metabolismo e características fisiológicas semelhantes (AXELSSON, 1993). Estas bactérias ocupam muitos nichos ecológicos como certos alimentos, boca, trato gastrointestinal e urogenital de homens e animais (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993). Muitas espécies de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e de outros gêneros ou espécies, patogênicos ou não (Mc MULLEN e STILLES, 1996).

Cepas de *Enterococcus spp.* têm sido isoladas de produtos alimentícios tais como azeitonas, alimentos fermentados, produtos lácteos e carnes. Estudos mostram que as enterocinas produzidas a partir destas bactérias possuem alta especificidade contra vários microrganismos, entre eles a *Listeria spp.*, podendo ser útil para o controle destes organismos em alimentos fermentados (ABEE, 1995).

A ocorrência de enterococos em alimentos processados ou não é favorecida por suas propriedades microbianas de sobrevivência a temperaturas de pasteurização, somada à capacidade de crescimento em condições adversas, como variações de temperatura, pH e salinidade (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

No entanto, parece ser consensual entre pesquisadores o princípio de que a seleção de *Enterococcus* para uso industrial deve ser fundamentada na ausência de quaisquer propriedades patogênicas ou de resistência a antimicrobianos (VANCANNEYT et al., 2002; DE VUYST et al., 2003).

Espécies de *Enterococcus* têm sido reconhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas e em animais (GIRAFFA, 2002; FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Nos últimos anos, algumas espécies têm adquirido importância em quadros nosocomiais e como patógenos oportunistas, devido à ação de fatores de virulência e resistência múltipla a antimicrobianos (ENDTZ et al., 1999; FRANZ et al., 1999, GIRAFFA, 2002).

Enterococos resistentes a antimicrobianos foram isolados em diferentes alimentos (produtos cárneos, laticínios e vegetais), assim como em amostras clínicas (sangue e fezes) de pacientes hospitalares (TAUBER et al., 1999; BORGÉN et al., 2000; GIRAFFA et al., 2000; LEMCKE e BÜLTE, 2000;

BAUMGARTNER et al., 2001; FRANZ et al., 2001; PEREZ-PULIDO et al., 2006).

A utilização de leite cru, obtido de maneira higiênica, oriundo de vacas sadias, associado a boas práticas de fabricação na produção do queijo Serra da Canastra, poderá agregar a este produto propriedades sensoriais diferenciadas dos queijos feitos com leite pasteurizado, devido à presença de bactérias lácticas adaptadas às condições do clima e da matéria prima, sendo fundamental no processo de fermentação, desenvolvendo as características sensoriais, e um possível fator de proteção baseado na atividade antimicrobiana das bactérias lácticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar aspectos de segurança do queijo Serra da Canastra comercializado na cidade de Araras – SP.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a adequação de amostras de queijo Serra da Canastra comerciais a padrões microbiológicos;
- Isolar e identificar espécies de enterococos provenientes de amostras do queijo Serra da Canastra utilizando provas bioquímicas e moleculares;
- Analisar o potencial de patogenicidade dos isolados de enterococos através de análises fenotípicas (produção de gelatinase e atividade hemolítica);
- Verificar a resistência a antimicrobianos de isolados de enterococos de queijo Serra da Canastra;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados identificados frente a cepas de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*;

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Queijo Canastra e Padrão de Qualidade**

No Brasil o consumo anual de queijos é de 2,3 kg per capita. O Estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro de queijos, com cerca de 200 t/ano, sendo 70 mil de queijo Minas artesanal, produzido em 519 dos 853 municípios mineiros que responde pela metade da produção nacional. A maior parte dessa produção é feita em pequenas e médias queijarias (CERRI; SOUZA, 2002).

Mesmo com as pressões de modernização dos processos de produção, as práticas tradicionais permanecem vivas e atuantes em Minas Gerais (VARGAS et al.,1998). Sobrevivendo a essas transformações, escondida na simplicidade e espalhada nas colinas e vales do Estado, resta a secular fabricação de queijo a partir de leite cru, da região da Serra da Canastra, produzido desde o século XVIII (FURTADO, 1980; VARGAS et al., 1998).

Atualmente, um expressivo número de famílias vive da produção e comercialização desse tipo de queijo. Um levantamento realizado nos municípios/áreas produtoras constatou a existência de cerca de 30 mil famílias de pequenos proprietários, totalizando aproximadamente 100 mil pessoas. Destes, 10.773 são produtores das quatro principais regiões do estado (Serra, Alto Paraíba, Serra da Canastra e Araxá), consideradas tradicionais e que produzem anualmente 33.570 toneladas de queijo em 46 municípios, gerando 26.870 empregos diretos (NÓBREGA, 2007).

A região da Serra da Canastra, localizada no sudoeste do Estado, abriga o parque nacional Serra da Canastra, criado para proteger as nascentes do Rio São Francisco, tem como núcleo a cidade de São Roque de Minas, localizada no Centro-Oeste do Estado. Fazem parte desta região os seguintes municípios: Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita (Portaria n° 694/04/MG – IMA, 2004).

O processo de produção do queijo Serra da Canastra no Estado de Minas Gerais deve obedecer as normas estabelecidas pela Lei n° 14.185, de 31 de Janeiro de 2002 (MG), que dispõe sobre o processo de produção de queijo artesanal, cujo regulamento foi aprovado pelo Decreto n° 42.645, de 05 de junho de 2002 (MG). Para efeito deste Regulamento, entende-se por queijo

Minas artesanal, o queijo elaborado, na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido. Com a promulgação da Lei nº 14.185, de 31 de Janeiro de 2002(MG), ações vem sendo desenvolvidas para melhoria da qualidade do queijo Serra da Canastra.

Segundo Pereira & Rigolin-Sá (2006) estudos realizados na Serra da Canastra, mostraram que análises dos produtos e constantes orientações aos produtores do queijo Canastra são trabalhos de extrema importância, para que estes obtenham o selo de qualidade (SIF) e possam comercializar legalmente seus produtos em todo território nacional e internacional. Ainda, segundo as autoras, a realização de análises microbiológicas, envolvendo todos os possíveis pontos de contaminação é importante para garantir um produto final de qualidade.

No período de 12/2004 a 12/2005, o projeto de apoio a agricultura familiar dos produtores do queijo Canastra no município de Medeiros (MG) da agência CNPQ, teve como objetivo definir as características de processamento e os níveis de adequação as normas de fabricação, com análises físico-químicas e microbiológicas de todas as amostras de água, leite e queijos coletados. Também foram adotadas medidas de difusão e aplicação de práticas de conservação ambiental e tratamento de água, adoção de técnicas e práticas de processamento, controle produtivo aliadas às técnicas de controle de custo de produção e melhor aproveitamento dos recursos, obtendo-se queijo Canastra com maior potencial comercial atendendo os padrões de qualidade exigidos de modo a propiciar a oferta de produto de maior valor agregado. (EDITAL CT-AGRO/MDA/CNPQ 022/2004).

O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) vem promovendo o cadastramento de produtores do queijo Canastra. Desta forma, o produtor passará a ter a garantia de origem e a estar de acordo com a Lei nº 14. 185/02, promovendo a rastreabilidade ao queijo, indicando sua procedência, sua qualidade, e conseqüentemente tirando da clandestinidade. Para chegar a este estágio, o produtor precisa cumprir uma série de exigências, a começar pela

sanidade e ordenha dos animais para obter matéria prima de boa qualidade (Portaria nº 517 do IMA). São exigidas também infra-estrutura adequada nas instalações (Portaria 518), e boas práticas de fabricação do queijo (detalhada na Portaria 523) (ASCOM/EMATER-MG, 2008).

A partir de 2006, o queijo Serra da Canastra também passou a ser alvo de pesquisa da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). O objetivo foi padronizar os métodos de fabricação utilizados, atendendo às exigências dos consumidores e garantir que as características de cada produtor sejam sempre constantes. Na pesquisa estão sendo realizadas análises físico-químicas do leite integral, soro, queijo e do “pingo” e análises microbiológicas, inclusive da água que abastece as queijarias, para garantir a qualidade do produto (REVISTA MINAS FAZ CIÊNCIA, 2006).

Segundo descrição de Borelli (2006a), o processamento do queijo da Serra da Canastra consta das seguintes etapas:

- Feito em um local adjacente à sala de ordenha, aonde o leite é filtrado de um balde para o tanque de fabricação. Para promover a coagulação do leite, é adicionado o coalho comercial e o “pingo”, que é o exsudado proveniente da massa de queijo na etapa de salga do lote produzido no dia anterior e composto por espécies de *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*.

- Aproximadamente uma hora após a adição do coalho e o pingo, ocorre o corte da coalhada, variando o tamanho do grão conforme as características de fabricação de cada micro região. Em seguida é promovida a mexedura da massa, e a dessoragem variando conforme a micro região.

- Em seguida, inicia-se o processo de enformagem em formas redondas para ganhar sua forma característica, aonde ocorre a remoção do soro por pressão manual.

- O queijo então é coberto com sal por aproximadamente seis horas, invertido, e depois salgado novamente por dezoito horas. Nesta ultima fase, ocorre a coleta do “pingo”.

- Após este período, o excesso de sal é removido, os queijos são retirados da forma, e dispostos em prateleiras de madeira sem controle de temperatura e umidade, ocorrendo a viragem todos os dias. A maturação ocorre de três a dez dias, variando conforme a micro região. Durante a maturação ocorrem desidratação e estabilização do produto e o

desenvolvimento de sabor levemente ácido, uma massa de cor creme claro, casca amarelo ouro e aroma característico do queijo Canastra.

Estudos demonstram que o sistema enzimático da microbiota presente nos queijos artesanais, fabricados a partir de leite cru, é mais complexo do que aquele presente na microbiota de queijos fabricados com leite pasteurizado, adicionados de fermentos selecionados, conduzindo diferenças na qualidade sensorial entre esses dois tipos de queijo (GRAPPIN & BEUVIER, 1997; PELÁEZ & REQUENA, 2005; BALLESTEROS et al., 2006; CABEZAS et al., 2007).

A Resolução – RDC n° 12 de janeiro de 2001 que determina os padrões microbiológicos para produtos prontos para o consumo e a Portaria n° 146 de 07 de março de 1996 (MARA, 1996) que determina os padrões microbiológicos para estabelecimento produtor, estabelecem para queijos de alta umidade, com bactérias lácticas abundantes e viáveis os seguintes parâmetros: Coliformes a 45° C ( $M = 5 \times 10^3$  e  $m = 10^3$ ), *Estafilococcus coagulase positiva* ( $M = 10^3$  e  $m = 10^2$ ), *Salmonella sp/25g* (ausência) e *L. monocytogenes /25g* (ausência).

### **3.2 Queijos e saúde pública**

A grande oferta de queijos dos mais variados tipos, aliada à ocorrência comum de bactérias patogênicas, em derivados lácteos, fizeram com que a contaminação microbiana de queijos assumisse uma relevância destacada para a saúde pública (CARVALHO, 2004). As bactérias patogênicas, que constituem maior ameaça à segurança de queijos são: *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* patogênica (De BUYSER et al.; 2001).

Dias et al.,(1995) analisaram 21 surtos provocados principalmente por queijos Minas frescal, ocorridos em diferentes cidades mineiras entre os anos de 1992 e 1994 e notificados ao Serviço de Vigilância Sanitária. Das 239 pessoas expostas aos alimentos, 218 (91,35%) apresentaram sintomatologia característica de intoxicação estafilocócica e 49 (20,5%) foram hospitalizadas. Do total de surtos notificados, 13 (61,90%) apresentaram coliformes termotolerantes com, contagens entre  $10^3$  e  $10^5$  NMP/g e 18 (85,7%) revelaram a presença de *S. aureus* entre  $10^5$  e  $10^9$  UFC/g do produto.

Silva e Castro (1995) avaliaram um surto provocado por queijo Minas, ocorrido na cidade de Contagem - MG, onde 14 das 15 pessoas expostas ao produto contaminado (93,31%) adoeceram. A análise do queijo fabricado artesanalmente a partir de leite cru revelou a presença de *Salmonella*, *S. aureus* ( $10^5$  UFC/g) e coliformes termotolerantes em quantidade superior a  $1,1 \times 10^5$  NMP/g. Diante das pesquisas realizadas e do período de incubação apresentado pelas pessoas expostas, foi concluído a ocorrência de infecção por *Salmonella* do grupo D associada à intoxicação estafilocócica.

Sabioni et al., (1998) relata surtos de intoxicação alimentar ocorrido em julho de 1987, na cidade de Ouro Preto, MG (Brasil) causado pelo consumo de queijo Minas, contaminado por *Staphylococcus aureus* com contagens de  $9,3 \times 10^7$  UFC/g. Detectaram-se cepas produtoras de enterotoxinas do tipo A, B, D e E. As amostras analisadas revelaram contaminação por coliformes termotolerantes acima de  $1,1 \times 10^5$  NMP/g. Devido aos sintomas característicos e à elevada contaminação, concluiu-se que o *Staphylococcus aureus* foi o agente responsável pelo surto.

Uma pesquisa realizada por Pereira et al., (1999) em 168 amostras de queijo Minas (20 frescal, 48 Canastra e 100 padronizado) coletadas em Belo Horizonte, mostrou ausência de *Salmonella ssp* em todas as amostras. Entretanto, verificou-se que 90% das amostras de Minas frescal, 81,2% de Minas Canastra e 52% de Minas padronizado apresentaram coliformes termotolerantes, acima dos valores permitidos pela legislação.

Em Cuiabá - MT, em 2001, Loguercio et al., analisaram 30 amostras de Queijo Minas artesanal obtidas em dois pontos de comercialização, observaram que 28 amostras (93,33%) apresentaram NMP  $> 10^2$  NMP/g para coliformes termotolerantes e somente duas amostras (6,67%) estavam dentro dos padrões legais exigidos. Para contagem de *S. aureus*, em 29 amostras (96,67%) observaram-se valores superiores a  $10^3$  UFC/g, com apenas uma amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal.

Carmo et al., (2001) coletaram amostras de queijos Minas e leite cru relacionados a dois surtos em Minas Gerais. No primeiro, 50 pessoas adoeceram após a ingestão de queijo Minas frescal, e no segundo surto; 328 pessoas apresentaram os sintomas após ingestão de leite cru. As análises

mostraram que *S. aureus* estava presente ( $2,4 \times 10^2$  a  $2,0 \times 10^9$  UFC/g) e produziram as enterotoxinas SEA, SEB e SEC.

Borelli (2002), analisando os principais indicadores higiênico – sanitários presentes na elaboração do queijo Serra da Canastra, observou que todas as amostras de água encontravam-se fora dos padrões legais de potabilidade (Portaria 1469 MS, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* e Clostrídios sulfito redutores foram isolados em 90% e 50% das amostras analisadas, respectivamente. O perfil microbiológico do leite cru utilizado para fabricação do queijo, utilizando-se como critério os padrões estabelecidos para leite pasteurizado tipo C (Resolução RDC 12/01 ANVISA, 2001) revelou que, 50% das amostras continham coliformes termotolerantes acima dos limites legais e 30% apresentaram *Staphylococcus coagulase* positiva com populações entre  $10^2$  a  $10^4$  UFC/ml.

Salotti et al. (2006) no período de junho a dezembro de 2002, avaliando 60 amostras de queijo Minas, sendo 30 amostras de produção artesanal e 30 de produção industrial fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Estadual ou Federal no comércio de Jaboticabal, observaram que 83,4 % das amostras artesanais e 66,7 % das amostras industrializadas apresentavam-se em desacordo com o estabelecido pela RDC 12/01 (ANVISA, 2001) quanto a presença de coliformes termotolerantes. Para contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva, 20 % das amostras artesanais e 10 % das amostras industriais, apresentaram-se em desacordo e verificou-se ausência de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*.

A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* é uma das doenças de origem alimentar mais comuns. De acordo com os dados da Fundação Ezequiel Dias, no estado de Minas Gerais entre 1995 e 2001 ocorreram 23 surtos, 660 casos e 1 óbito, devido ao consumo de queijos contaminados por toxinas estafilocócicas (CAMARGO, 2004). Entre 2001 e 2003, no município de São Jose do Rio Preto foram notificados 4 surtos e 52 casos de intoxicação alimentar por *S. aureus* (PERESI et al., 2004).

No estado de São Paulo, *Bacillus cereus* foi identificado como agente etiológico de 45 (4,8%) dos 932 casos de doenças transmitidas por alimentos notificados à vigilância epidemiológica em 2002 (SÃO PAULO, 2002). Surtos

relacionados a *Bacillus cereus* já foram relatados nos EUA, Reino Unido, Canadá, Holanda, Escandinávia e outros países, envolvendo diversos alimentos como fonte de veiculação, dentre eles produtos cárneos, laticínios, condimentos e arroz oriental. O “British Columbia Center for Disease Control” (2002) relatou a ocorrência de dois surtos de doença transmitida por alimentos no Canadá, envolvendo mais de 100 pessoas devido à contaminação de leite por *B.cereus*.

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico responsável por aproximadamente 25% das mortes relacionadas a doenças transmitidas por alimentos nos EUA anualmente. Na Europa entre 1991 e 2001 foram notificados 2.065 casos de listeriose, porém os órgãos competentes estimam que o número real seja maior (LUDÉN et al., 2004)

### **3.3 Microrganismos patogênicos em queijo**

#### **3.3.1 Coliformes termotolerantes**

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota normal do intestino de animais de sangue quente, portanto, a sua presença nos alimentos, constitui um indicador de contaminação fecal (PERESI, et al., 2001).

A contaminação por coliformes termotolerantes pode ser originada de uma higienização inadequada das superfícies e equipamentos de uma planta de processamento. Neste caso, sua presença reflete a qualidade da sanitização além da poluição direta do produto (BANWART, 1989).

Na produção de queijos, os coliformes são responsáveis pelo desenvolvimento de estufamento precoce, caracterizado pela produção de gás H<sub>2</sub> em 1 a 2 dias após sua fabricação (FOX et al., 2000).

A presença desses microrganismos, em índices condenatórios, já foi de maneira enfática, relatadas em queijos Minas (COLEN et al., 1984; PEREIRA et al., 1987; LAICINI, 1993; SOUZA et al., 1993; DIAS et al., 1995; RODRIGUES et al., 1995; CARVALHO et al., 1996). Essas contaminações além de indicar as más condições higiênicas do produto, indica, também, a possibilidade da presença de cepas patogênicas pertencentes aos grupos EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa) e EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) (FRANCO E LANDGRAF, 2002).

Frank et al.,(1977) correlacionaram a presença de coliformes termotolerantes em queijo tipo Camembert, com a ocorrência de *E. coli* enteropatogênica, o que também foi demonstrado por Frank & Marth (1978). Segundo Santos et al., (1995) a *Escherichia coli* enterotoxigênica é a causa comum de “diarréia de viajantes”.

### **3.3.2 Estafilococos coagulase positiva e negativa**

Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processos moderados de temperatura, suas enterotoxinas são termoestáveis e resistentes a temperaturas de processamento de produtos lácteos (FREITAS & MAGALHÃES, 1990).

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos quando estes estão contaminados por espécies de estafilococos capazes de produzirem enterotoxinas. Relata-se ser necessária entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC de *S. aureus* /g de alimentos, para que a enterotoxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar. Os principais sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarreias, sudorese, câibras abdominais dolorosas, dores de cabeça e calafrio. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, após a ingestão do alimento contaminado (FRANCO, LANDGRAF, 2002).

No Brasil vários estudos têm demonstrado alta contaminação de leite e derivados por *S. aureus*. Santos et al., (1981) ao avaliarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 46,9% apresentaram *S. aureus* em contagens variando de  $3,0 \times 10^3$  a  $9,8 \times 10^5$  UFC/ml.

Os *S. aureus* são frequentemente pesquisados em alimentos, sendo o queijo um dos principais veículos causadores de intoxicação alimentar, pois sua presença está associada a práticas de higiene e manipulação inadequadas (REIBNITZ et al., 1998).

Sabioni (1998), citam casos de intoxicação estafilocócica causada por queijo Minas Frescal, assim como Anunciação et al., (1994), que relatam a presença de enterotoxinas estafilocócicas também em queijo Minas Frescal.

### **3.3.3 *Salmonella* spp**

Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive Brasil. Na Inglaterra e países vizinhos, 90% dos casos de DTAs são causados por *Salmonella*. Dados recentes publicados nos Estados Unidos, Canadá e Japão indicam que os relatos de ocorrência de salmonelose de origem alimentar aumentam cada ano (FRANCO, LANDGRAF, 2002).

Segundo De Buyser et al., (2001), nos 2861 surtos de origem alimentar ocorridos na França, no período de 1988 a 1997, *Salmonella* foi o principal agente etiológico (49%) e a porcentagem dos derivados do leite (queijos) nestes surtos foi de 1,8%.

A presença de *Salmonella* em queijo de Coalho e queijo Manteiga tem sido relatada em algumas pesquisas (FLORENTINO; MARTINO, 1999). Sabe-se, também que *Salmonella* mantém-se viável em queijo contaminado por longo período de tempo (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1990), o que ressalta a importância do controle de qualidade microbiológico do produto, visto que a legislação brasileira estabelece ausência desta bactéria em alimentos (BRASIL, 2001).

### **3.3.4 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* tem sido, atualmente, reconhecido como um importante patógeno de origem alimentar, podendo ser isolado de uma ampla variedade de produtos derivados do leite (SILVA et al., 1998). Dentre estes produtos, os queijos têm sido os mais extensivamente estudados.

Em 2000-2001 um surto nos EUA foi associado ao consumo do queijo fresco tipo mexicano de fabricação caseira onde se utilizou leite cru. Doze pessoas foram acometidas pela doença (incluindo 10 gestantes), provocando 5 abortos, 3 partos prematuros, 2 recém-nascidos infectados, um adulto acometido por meningite e outro desenvolvendo abscesso cerebral (CENTERS for DISEASE CONTROL and PREVENTION, 2001).

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos tem sido relatada em muitos estudos (SILVA et al., 1998; CATÃO; CEBALLOS, 2001; KABUKI et al., 2004). Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por esta bactéria, principalmente os de alta e média

umidade. A contaminação de queijos por *Listeria monocytogenes* está relacionada com a contaminação do leite cru, o que pode ocorrer durante o processo de ordenha, estocagem, transporte até a indústria e a partir do ambiente do processamento (TOMPKIN, 2002; WAAK; THAM; DANIELSSO-THAM, 2002; KABUKI et al; 2004).

### **3.3.5 *Bacillus cereus***

Este microrganismo produz uma série de fatores de virulência, incluindo múltiplas hemolisinas, fosfolipases e proteases. *Bacillus cereus* causa dois tipos de doenças de origem alimentar: a síndrome diarréica e a síndrome emética além de diversas infecções localizadas ou sistêmicas, como endocardites, meningites, periodontite, infecções oculares, osteomielite e septicemia. Estas patologias são menos frequentes se comparadas às do trato gastrointestinal. Em geral, a gama de diversas toxinas e fatores de virulência de *B. cereus*, principalmente em infecções sistêmicas, têm sido pouco estudados (SCHOENI; WONG, 2005; GRANVM, 1994).

Um número dessas espécies bacterianas pode ser encontrado em diversos alimentos, incluindo produtos in natura, frescos e processados. Em um estudo com carne crua, produtos cárneos e aditivos, o *B. cereus* foi encontrado em 6,6% de 534, 18,3% de 820 e 39,1% de 609 amostras, respectivamente em populações de  $10^3$  UFC/g (JAY, 2005).

Andersson et al., (1995) expuseram a facilidade da contaminação da planta de processamento de leite devido à contaminação inicial do leite cru que chega ao estabelecimento, à sobrevivência dos esporos à pasteurização e à forte capacidade de adesão destes esporos às superfícies de aço inoxidável, que podem em grande parte permanecer aderidos mesmo após o processo de limpeza das instalações.

Esper (2006) avaliando 45 amostras de ricota comercializadas no município de Campinas observou que 46,7% das amostras estavam em desacordo com o estabelecido pela RDC 12/01 (ANVISA). Além dos critérios microbiológicos exigidos pela legislação uma avaliação complementar mostrou que 51,1% das amostras estavam contaminadas por *B. cereus*, sendo que 28,9% com contagem na faixa de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g. Quanto ao potencial enterotoxigênico de *B. cereus*, 85,7% (36/45) dos isolados analisados, foram

positivos para o kit BDE-VIA.

Rocha (2004) avaliando a presença de *B. cereus* em indústria processadora de queijo Minas Frescal, constatou a presença de *B. cereus* em todo ambiente de produção e na maioria das amostras de queijos analisados.

### **3.4 Bactérias láticas em queijos artesanais**

Em muitos países, queijos fabricados em pequena escala, a partir de leite cru, ordenhados pelos próprios produtores, são produzidos artesanalmente, utilizando técnicas tradicionais. Na produção desses queijos, normalmente não se empregam culturas iniciadoras comerciais, sendo esta função desempenhada pelas culturas láticas naturalmente presentes no leite. Pouco se sabe sobre as bactérias láticas envolvidas na fabricação e maturação de queijos artesanais, sendo que a maioria das informações encontradas na literatura, diz respeito aos queijos espanhóis (COGAN et al., 1997).

Em um trabalho realizado com o queijo Manchego, produzido na Espanha a partir de leite cru de ovelha, na região de La Mancha, Ballesteros et al. (2006) observaram que as espécies predominantes encontradas foram *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, seguida de *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Lactobacillus plantarum*. Os autores também consideraram que os atributos sensoriais no Manchego fabricado artesanalmente foram superiores aos apresentados pelo mesmo queijo, quando fabricado industrialmente.

Zamfir et al., (2005) ao avaliarem a biodiversidade de bactérias láticas em 110 amostras de produtos láticos artesanais produzidos na Romênia, entre estes, os queijos Branza Dulce, Telemea e Urda, observaram que havia predominância de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc sp.* e *Enterococcus sp.* Entre o grupo *Enterococcus*, uma nova espécie, *E. sacharominimus*, foi encontrada, o que demonstra a importância dos produtos artesanais como fonte potencial de microrganismos, cujas propriedades possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas culturas iniciadoras.

O queijo fresco mexicano é fabricado artesanalmente em várias propriedades rurais, com leite cru de vaca, utilizando-se de técnicas tradicionais, que inclui acidificação pelas bactérias láticas naturalmente

presentes no leite, sendo as espécies predominantes: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, seguida por *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus casei* (TORRES & CHANDAN, 1981).

### 3.5 Atividades antimicrobianas de bactérias lácticas

Entre os microrganismos presentes nos diversos tipos de queijos, encontram-se as bactérias lácticas. O grupo das bactérias lácticas compreende 11 gêneros de bactérias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (MOGENSEN et al., 2003).

O leite cru constitui boa fonte de bactérias lácticas passíveis de serem utilizadas pela indústria laticinista nacional, especialmente pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima, sendo ainda necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (ALEXANDRE et al., 2002).

Culturas iniciadoras específicas a uma particular variedade de queijo, baseada na seleção de estirpes isoladas a partir do próprio produto, presumivelmente, estarão mais bem adaptadas, além de assegurarem propriedades sensoriais semelhantes ao queijo original, quando fabricado com leite tratado termicamente (ESTEPAR et al., 1999).

Carvalho et al. (2005), isolando bactérias lácticas de queijos de coalho artesanal fabricado com leite cru, comercializados em Fortaleza (CE), observaram a predominância dos Gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* sugerindo que durante o processamento deste queijo, as altas temperaturas que variam de 40° a 60°C para cozimento da massa, promoveria a seleção destas bactérias mais resistentes a temperaturas elevadas.

As atividades metabólicas das bactérias lácticas, não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000)

Existem várias substâncias antimicrobianas que podem ser produzidas por bactérias Gram positivas incluindo as lácticas. Podem ser citadas: ácidos

orgânicos (como ácido lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica denominadas bacteriocinas (NAIDU et al., 1999).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas têm despertado grande interesse científico e industrial. Estes interesses estão relacionados com o fato de algumas bacteriocinas inibirem bactérias deteriorantes e patogênicas (ADAMS & NICOLAIDES, 1997; MAGRO et al., 2000).

O espectro inibidor geralmente restrito a bactérias Gram positivas, sendo que várias bacteriocinas produzidas são ativas contra *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

Alexandre et al., (2002), utilizaram 192 cepas de bactérias lácticas de cinco amostras de queijo Minas artesanal do Serro, para avaliar a atividade antimicrobiana frente a microrganismos indicadores. Como resultado da prova de inibição direta, 48 cepas isoladas (25%) foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

As bacteriocinas são peptídios ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberadas no meio extracelular, que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre espécies intimamente relacionadas com o microrganismo produtor (BRUNO e MONTVILLE, 1993; EIJSINK, 1996).

Segundo Cleveland et al., (2001), as bacteriocinas diferem dos antibióticos principalmente quanto à síntese, ao espectro e modo de ação, à toxicidade e aos mecanismos de resistência.

Até 1995, mais de 100 bacteriocinas de bactérias lácticas foram identificadas (CHEN, 1997). Elas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas. Também podem variar quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas (KAISER e MONTVILLE, 1996; VERHEUL et al., 1997).

A identificação de bacteriocinas de bactérias lácticas com ação contra microrganismos patogênicos e deteriorantes ganhou interesse para a aplicação como conservantes em alimentos (DE VUYST e VANDAMME, 1994; RODRÍGUES et al., 2000), principalmente devido a sua contribuição no

desenvolvimento de “*flavor*”, textura, vida de prateleira e preservação nos alimentos (RAY, 1992; DU TOIT et al., 2000; OLASUPO et al., 2001; LEROY e DE VUYST, 2002; SARANTINOPOULOS et al., 2002; GIRAFFA, 2003).

Além disso, muitas bacteriocinas são estáveis ao calor, podendo ser aplicadas em combinação com tratamento térmico. Assim, as principais propriedades das bacteriocinas são: atividade bactericida, modo de ação irreversível, estáveis nos alimentos, biodegradáveis, digestíveis, seguras para saúde e ativas em baixas concentrações (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

### **3.5.1 Classificação e modo de ação das bacteriocinas**

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas estão distribuídas em 4 classes, de acordo com a sua estrutura e características bioquímicas. Em geral, a classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, é constituída por peptídios termoestáveis de baixo peso molecular (<5 kDa), diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados; a classe II é composta por pequenos peptídios (<10 kDa) termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III é representada por peptídios termolábeis de alto peso molecular (>30 kDa) como helveticina J; na classe IV encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Contudo, Cleveland *et al.* (2001) acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas. Kemperman et al., (2003) sugeriram a inclusão de uma quinta classe para abrigar as bacteriocinas circulares.

Em 2005, Cotter et al., propuseram uma nova classificação, a qual subdivide as bacteriocinas em duas categorias distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não lantibióticos (classe II), enquanto os peptídios de alto peso molecular termolábeis, formalmente componentes da classe III, seriam separadamente designados de “bacteriolisinas”. Os autores sugerem ainda que a classe V (KEMPERMAN et al., 2003) seja incorporada à classe II dos não lantibióticos como uma subclasse, já a classe IV seria extinta.

Drider et al.,(2006) distribui as bacteriocinas em três grandes classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas (*Tabela 1*).

**Tabela 1.** Classificação das bacteriocinas segundo Drider et al.,(2006).

<b>Classificação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Subcategorias</b>	<b>Exemplos</b>
Classe I ou Lantibióticos	peptídeos que contém lantionina ou $\beta$ -lantionina	tipo A (molécula lineares, < 4KDa)  tipo B (molécula globular)	nisina,subtilina, epidermina mersacina, mutacina, actagardina
Classe II	classe heterogênea de pequenos peptídeos termoestáveis	subclasse (bacteriocinas pediocina-antilisterial)  subclasse IIb (compostas por dois peptídeos) subclasse IIc (outras bacteriocinas)	Ila pediocina, enterocina, sakacina  plantaricina, lactacina F lactococina
Classe III	grandes peptídeos (>30 KDa) termolábeis		helveticina J, millericina B

Os estudos sobre o mecanismo de alguns lantibióticos e pequenos peptídios termoestáveis revelam que a ação das bacteriocinas ocorre na membrana citoplasmática (MONTVILLE e CHEN, 1998). Dependendo de sua concentração, as bacteriocinas são bactericidas ou bacteriostáticas.

Franco e Landgraf (2002) citaram que o modo de ação ainda não está suficientemente elucidado, mas sabe-se que a porção protéica é fundamental para a atividade da bacteriocina. Acredita-se que a ação depende da ligação a receptores da superfície celular bacteriana, com permeabilização da membrana citoplasmática e formação de canais iônicos que causam o fluxo rápido de componentes celulares de baixo peso molecular. Há dissipação do gradiente eletroquímico na membrana citoplasmática, resultando em uma situação incompatível com a viabilidade celular. Evidências indicam que ocorrem alguns efeitos secundários tais como degradação de macromoléculas vitais como

proteínas, DNA e RNA, inibição de síntese de proteínas e de peptoglicano, responsáveis pela integridade celular.

A primeira fase na formação de poros pela bacteriocina envolve as interações eletrostáticas entre a carga positiva e os resíduos polares da bacteriocina com os da membrana alvo (CHIKINDAS, 1993; ABEE et al., 1995). Nesta fase, por exemplo, a bacteriocina é sensível a enzimas proteolíticas. A segunda fase é irreversível e envolve mudanças letais em cepas sensíveis à bacteriocina (DESMAZEAUD, 1997).

As bacteriocinas apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar (HERNÁNDEZ, 2005). No entanto tais propriedades antibacterianas variam em seu espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas. Além disso, são efetivas em baixa concentração, por exemplo, 10 mg.kg<sup>-1</sup>, e não promovem alteração na qualidade sensorial do produto (KLAENHAMMER, 1993; VLAEMYNCK et al., 1994; ABEE, 1995; CLEVELAND et al., 2001; HERRANZ, 2001; LEROY e DE VUYST, 2002; MORENO et al., 2003).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (BARNBY-SMITH, 1992; LYON et al., 1995; GIRAFFA, 2003).

De modo geral para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: a linhagem produtora deve ter status GRAS; a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL et al., 1995).

### 3.5.2 *Enterococcus* e antagonismo frente à patógenos em alimentos

Essas bactérias, antes um subgrupo do gênero *Streptococcus* passaram a pertencer ao gênero *Enterococcus* a partir de 1984. A utilização dos *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas, ou exposição dos alimentos a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis. Em alimentos fermentados por bactérias do gênero *Enterococcus*, o número elevado desses microrganismos não tem o mesmo significado (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Atualmente 20 espécies pertencem a este gênero, das quais o *E. faecium* e o *E. faecalis* são as mais encontradas. Os enterococos podem estar presentes no solo, na superfície das águas, em plantas e vegetais. Podem crescer em alimentos crus e multiplicar-se durante as fermentações, devido a sua habilidade em sobreviver em condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Estas bactérias podem resistir a condições normais de processamento de alimentos (GIRAFFA, 2003).

No que diz respeito à produção de bacteriocinas por enterococos, esta parece ser uma característica comum para cepas associadas com alimentos. Estas substâncias antibacterianas são chamadas enterocinas (SABIA et al., 2002).

Tem sido relatado que cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* são hábeis em produzir enterocinas com capacidade de inibir a *Listeria spp.*, quando estas são desenvolvidas em leite e queijos (GIRAFFA, 1995; NUNEZ et al.,1997; ENNAHAR et al.,1998).

Segundo Villani et al., (1993); Lyon et al., (1995) nos últimos anos tem-se noticiado vários casos de doenças após ingestão de alimentos contaminados por microrganismos, dentre eles a *Listeria monocytogenes*, causadora de listeriose em mulheres grávidas, recém nascidos e pessoas imunodeprimidas. A refrigeração e outros métodos de conservação não têm

prevenido a sobrevivência e crescimento da *L. monocytogenes* em alimentos contaminados.

Giraffa et al.,(1995) utilizando *E. faecium* 7C5 como microrganismo produtor, comprovaram o poder de inibição da enterocina frente a *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Observaram também que a combinação dos efeitos da diminuição do pH e ação da enterocina possuem efeito sinérgico.

Mckay (1990) comprovou a atividade antimicrobiana da bacteriocina produzida pelo *E. faecium* diante da *Listeria spp.* Quando o *E. faecium* e a *L. innocua* cresceram em culturas separadas a contagem de cada microrganismo chegou a 10<sup>9</sup> UFC/mL, porém no cultivo simultâneo a *L. innocua* foi fortemente inibida, resultado que demonstra que a produção de enterocina ocorre simultaneamente com o crescimento exponencial do *E. faecium*.

Rodrigues et al.,(2000) observaram que as enterocinas produzidas por *E. faecalis* TAB 20 e TAB 52 e *E. faecium* TAB 7 inibiram microrganismo patogênicos e deteriorantes presentes em produtos lácteos, tais como, cepas de *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria sp.* e *Lactobacillus buchneri*.

Nascimento (2007) avaliando a ação de culturas produtoras de bacteriocinas sobre alguns patógenos Gram-positivos em diferentes meios e derivados lácteos, observou que as bacteriocinas produzidas por *Lb. Plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 apresentaram atividade inibitória sobre *L. monocytogenes*. Já a nisina produzida por *Lac. lactis subsp. lactis* ATCC 11454 demonstrou espectro de ação mais amplo, porém com menos atividade.

As bacteriocinas produzidas por enterococos adicionados aos alimentos mostram-se como uma boa opção para melhorar a qualidade e sanidade de vários alimentos fermentados sem influenciar o crescimento da cultura iniciadora (LYON et al., 1995; MAISNIER – PATIN et al., 1996; CALLEWAERT et al., 2000; SARANTINOPOULOS et al., 2002). Cepas de enterococos têm sido isoladas de queijo artesanais e suas culturas têm sido propostas como starter em queijos como Cheddar e Fontina (PARENTE e HILL, 1992).

Este gênero apresenta características relevantes para ser empregado em tecnologia de alimentos e como probióticos (CINTAS, 1997). Contudo, existe dificuldade em regulamentar seu emprego na indústria de alimentos, apesar de não haver consenso quanto à possível patogenicidade deste gênero. Salminen e Von Wright (1993) relataram que *E. faecalis* poderia eventualmente

comportar-se como patógeno oportunista, porém não mencionaram a espécie *E. faecium*

Os *Enterococcus* são bactérias comensais que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e de animais. Mesmo não sendo considerados como microrganismos altamente patogênicos, os *Enterococcus* estão entre os organismos mais comumente encontrados em infecções nosocomiais (KUHN, 2000).

*Enterococcus* não são particularmente virulentos quando comparados com outros microrganismos da microbiota intestinal (GOLDMANN, 1992; GORDTS et al., 1995). Entretanto, sua capacidade de causar doenças em pacientes imunocomprometidos, recém nascidos e idosos hospitalizados tem levado ao reconhecimento de sua importância na etiologia de infecções hospitalares, entre as quais urinárias, bacteremias, endocardites e septicemias neonatais (WILLEY et al., 2003; MORRISON et al., 1997a).

Giraffa et al., (1995) afirmam que os enterococos, assim como, outras bactérias lácticas poderiam ocasionalmente estar envolvidos em infecções clínicas, porém muitas linhagens podem ser consideradas seguras para o emprego em alimentos. Em 1996, o “Advisory Committee on Novel Foods and Processes” do Reino Unido aprovou o uso de *E. faecium* K770 como cultura láctica em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003).

Antes de uma bactéria ser considerada para a aplicação na área de alimento, informações como o espectro antimicrobiano, características bioquímicas, genéticas, ausência de quaisquer propriedades patogênica ou de resistência a antimicrobianos e a eficácia em alimento devem ser conhecidos (VANCANNEYT et al., 2002; DE VUYST et al., 2003).

### **3.5.3 Os fatores de virulência**

Substâncias produzidas pelos microrganismos que podem causar dano ao hospedeiro, por exemplo: toxinas bacterianas, são referidas como fatores de virulência. O termo passou a significar qualquer componente do microrganismo que seja exigido para provocar doença que potencialize sua capacidade para isso (SCHAECHTER et al., 1999).

De acordo com esta definição ampliada, mesmo uma substância que, purificada, não seja tóxica para o tecido do hospedeiro seria considerada um

fator de virulência se, em sua ausência, o microrganismo se tornasse consideravelmente menos capaz de provocar doença (menos virulento). Desta definição estão excluídos os genes e produtos de genes, essenciais ao crescimento normal do microrganismo. Assim um fator necessário para o crescimento de uma bactéria em meio de cultura em laboratório, não é considerado um fator de virulência, ao contrário de um fator que aumente a capacidade da bactéria em invadir a corrente sanguínea de seres humanos (CAMARGO, 2005).

Fatores de virulência foram detectados em *Enterococcus* isolados a partir de amostras clínicas, ambientais e de alimentos (EATON e GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; SEMEDO et al., 2003; PÉREZ-PULIDO et al., 2006). *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* são exemplos de espécies nas quais foram detectados alguns destes determinantes (QIN et al., 2000; MANNU et al., 2003; RICE et al., 2003; SEMEDO et al., 2003).

As propriedades de patogenicidade e virulência destes fatores não estão totalmente elucidadas, embora inúmeras pesquisas tenham contribuído para o esclarecimento de algumas das ações, sendo comprovadas em experimento utilizando modelos animais e culturas de células (DUPONT et al., 1998; SCHLIEVER et al., 1998; SINGH et al., 1998).

Em *Enterococcus*, os genes determinantes de virulência estão associados á plasmídios altamente transmissíveis. Pesquisas revelam que propriedades, como a produção de citolisina e a capacidade para adesão, podem ser transmitidas através de mecanismos de transferência (GILMORE et al., 1994).

Entre os fatores de virulência mais conhecidos em enterococos está a resistência intrínseca a antimicrobianos comumente usados no tratamento da doença e, mais importante ainda, é a habilidade em adquirir genes que conferem alta resistência à vancomicina e à teicoplanina pela transferência de plasmídeos (HANDWERGER & SKOBLE, 1995).

### **3.5.4 Resistência a antimicrobianos**

Enterococos nas últimas décadas têm emergido como um importante patógeno hospitalar em pacientes imunodeprimidos e em unidades de

tratamento intensivo. A causa de infecções por enterococos adquiridas em hospitais é em parte devido ao aumento do uso de antimicrobianos de largo espectro. *E. faecalis* é o microrganismo isolado mais frequentemente, estando associado a 80-90% das infecções humanas, seguido pelo *E. faecium*, encontrado em 10-15% das infecções (KONEMAN et al., 2001).

A resistência a antimicrobianos observada em enterococos pode ocorrer tanto naturalmente (resistência intrínseca) como ser adquirida (resistência transferível) (KLARE et al., 2001). Exemplos de resistência intrínsecas são observados à cefalosporinas, monobactams, aminoglicosídeos (baixo níveis), lincosamidas e polimixina (LECLERCQ, 1997; MORRISON et al., 1997b). A resistência à ampicilinas (especialmente em *E. faecium*), tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos (altos níveis), cloranfenicol, quinolonas e estreptograminas são exemplos de resistência adquirida, assim como a resistência ao grupo dos glicopeptídeos, particularmente, à vancomicina (FOULQUIÉ MORENO, et al., 2006).

Enterococos não são somente intrinsecamente resistentes a alguns antimicrobianos, mas são caracterizados como possuidores de uma potente e única habilidade de troca de material gênico (GIRAFFA, 2002). Um grande uso de drogas promotoras de crescimento em rações animais tem causado um aumento na resistência aos antimicrobianos em enterococos de origem animal, sendo que esta resistência também parece ter-se propagado para enterococos em populações humanas (KÜHN, 2003).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras**

Vinte e sete amostras de queijo Minas Serra da Canastra foram coletadas em estabelecimento varejista na cidade de Araras-SP. As amostras foram transportadas e mantidas a 4°C até o início das análises.

Quatro porções de 25 g de cada amostra, foram divididas e pesadas em balança semi analítica e homogeneizadas em um homogeneizador de pistões com diluentes específicas para cada microrganismo.

## **4.2 Análises Microbiológicas**

Os parâmetros microbiológicos avaliados foram aqueles definidos pela RDC nº 12/2001 (ANVISA, 2001) para queijos de alta umidade acrescido da determinação de *Bacillus cereus* e Enterococos.

### **4.2.1 Determinação de coliformes termotolerantes**

A contagem foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável-NMP- de três tubos, segundo recomendação da *American Public Health Association – APHA* (KONACKI; JOHNSON, 2001). Cada unidade amostral de 25 g foi homogeneizada com 225 ml de citrato de sódio 2% (Merck) e as diluições decimais seriadas foram inoculadas em Caldo Lauryl Sulfate Tryptose (Oxoid)- LST. As culturas dos tubos com resultados presuntivo positivo (produção de gás) após 24 e 48h a 35°C foram transferidas para o caldo EC (Oxoid) e incubados em banho-maria a 45°C por 24°C para confirmação da presença de coliformes termotolerantes.

### **4.2.2 Determinação de estafilococos coagulase positiva**

A determinação foi realizada utilizando-se o método recomendado pela APHA (BENNETT; LANCETTE, 2001). Cada unidade amostral de 25 g foi homogeneizada com 225 ml de citrato de sódio 2% (Merck) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície do ágar Baird Parker- BP (Oxoid) e as placas foram incubadas a 35°C por 48h. Cinco colônias suspeitas de cada amostra foram selecionadas e transferidas para Caldo Infusão Cérebro Coração-BHI (Oxoid), e incubadas a 35°C por 24h para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração de Gram e dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

### **4.2.3 Detecção de *Salmonella* spp**

A determinação de *Salmonella* foi realizada segundo recomendação da APHA (ANDREWS et al., 2001). Vinte e cinco gramas de amostra foi transferida para frascos contendo 225 ml em água peptonada tamponada-BPW (Merk) e incubados a 35°C durante 18 a 24h. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo Tetrionato-TT (Oxoid), incubado a 43°C e caldo Rappaport Vassiliadis-RV (Oxoid), incubados a 42°C durante 24h. O

plaqueamento diferencial foi realizado por transferência com alça microbológica dos caldos seletivo, para superfície do ágar Xylose Lysine Desoxycholate-XLD (Difco), ágar Hektoen enteric-HE (Oxoid) e ágar Bismuto Sulfito-BS (Difco) e incubados a 35°C/24h. As colônias típicas foram transferidas para ágar Tríplice Açúcar e Ferro-TSI (Difco) e ágar Lisina e Ferro-LIA (Difco) e incubadas a 35°C por 24 h. As culturas com reações típicas em TSI e LIA foram submetidas às provas bioquímicas e sorologia.

#### **4.2.4 Detecção de *Listeria monocytogenes***

As análises foram realizadas segundo o método recomendado pelo "Canadian Health Product and Food Branch" (PAGOTTO et al., 2001). Cada unidade de 25 g de amostra foi homogeneizada com 225 ml de caldo de Enriquecimento para *Listeria* (Oxoid- formulação UVM), suplementado com 25 mg/l de ácido nalidíxico (Oxoid) e 7,5 mg/l de acriflavina (OXOID)-LEB e incubada a 30°C. Após 24h e 48h de incubação, 0,1 ml do caldo LEB foi inoculado em 10 ml de caldo Fraser Modificado (Oxoid), incubado a 35°C/48h. Após incubação foi semeado por estrias em ágar Oxford Modificado (ágar Oxford da Oxoid), suplementado com 10 mg/l de colistina (Sigma) e 20 mg/l de moxalactam (Sigma)-MOX e ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (Difco) suplementado com 20 mg/l de moxalactam (Sigma) -LPM e incubados a 35°C e 30°C, respectivamente por 48h. Após seleção de colônias típicas foi realizado caracterização morfológica e testes bioquímicos.

#### **4.2.5 Determinação de *Bacillus cereus***

A determinação desse microrganismo foi realizada através do método recomendado pela APHA (BENNETT, BELAY, 2001). Cada unidade amostral de 25 g foi homogeneizada com 225 ml de citrato de sódio 2% (Merck) e as diluições decimais seriadas foram realizadas e inoculadas em superfície em ágar manitol-gema de ovo-polimixina-MYP (Difco) e incubadas a 30°C/24 h. As colônias típicas de *B. cereus* foram isoladas e submetidas aos seguintes testes de confirmação: verificação de crescimento rizóide em ágar nutriente (*Nutrient Agar*) prova da utilização da glicose em anaerobiose em Caldo Glicose-Vermelho de Fenol (*Fenol Red Glucose Broth*), prova de redução de nitrato a nitrito em Caldo Nitrato (*Nitrate Broth*), prova de Voges-Proskauer (*Modifiel VP*

*medium*), e prova de decomposição da tirosina em ágar tirosina (*Tyrosine Agar*) elaborados com ingredientes oriundos de diversas marcas comerciais, segundo formulação recomendada pelo FDA ( *U.S. Food and Drugs Administration, 2001*).

#### **4.2.6 Contagem de bactérias do Gênero *Enterococcus***

A contagem foi realizada segundo a metodologia recomendada pela APHA (HARTMAN et al., 2001). Cada unidade amostral de 25 g foi homogeneizada com 225 ml de citrato de sódio 2% (Merck) e as diluições decimais seriadas foram semeadas na superfície de Agar Kenner Fecal *Streptococcus*-KF (Difco) e as placas incubadas a 45°C por 2 dias, afim de se suprimir o crescimento de uma possível microbiota acompanhante (*Lactobacilli* e outros *Streptococci* lácticos).

Cento e oitenta e uma colônias típicas em ágar KF *Streptococcus* foram submetidas à confirmação de gênero (HARTMAN et al., 2001) através da coloração de Gram para observação da morfologia (cocos Gram positivos, em pares ou, eventualmente, em cadeias curtas), teste de atividade da catalase, crescimento em 6,5% de NaCl em caldo *Brain Heart Infusion*-BHI (Biobrás), crescimento em pH 9,6; a 45°C e 10°C, em caldo BHI e crescimento em ágar Bile Esculina (Oxoid).

Cento e quarenta e sete colônias confirmadas para o gênero de *Enterococcus* (cocos Gram positivo, catalase-negativas, capazes de crescer em pH 9,6, e a temperaturas de 45°C e 10°C e na presença de bile com hidrólise da esculina) foram submetidas a identificação de espécie (*E. faecium* e *E. faecalis*), pela técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR). Nestes isolados foram também investigados a presença de gelatinase e hemolisina através de testes fenotípicos de detecção de fatores de virulência.

##### **4.2.6.1 Identificação de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* através de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR**

###### **4.2.6.1.1 Extração de DNA**

A metodologia utilizada foi a preconizada por Furrer et al., (1991) com modificações, para extração do DNA bacteriano dos isolados confirmados como *Enterococcus*. Inicialmente, cada um dos isolados foi inoculado em caldo

BHI e incubados a 35°C/ 24h em seguida, 600 µl foram transferidos para tubos *eppendorf* e centrifugados a 13000 xg por 10 min.

Após o descarte do sobrenadante, o *pallet* foi ressuspendido em 95 µl de tampão PCR 1x (50 mM KCL, 10 mM Trisa HCl), ao qual foi adicionado 4 µl de solução de lisozina (50 mg/ml) e mantido a temperatura ambiente por 15 min. Na próxima etapa, adicionou-se 1 µl de proteinase K (20 mg/ml), com incubação a 60°C (banho-maria), durante 60 min. Em seguida, a amostra de DNA dos isolados foram submetidas a 95°C/8 min e estocada a - 20°C.

#### **4.2.6.1.2 Reação de polimerização em cadeia – PCR**

Os *primers* utilizados estão listados na *Tabela 2*. Para a identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, foram utilizados, respectivamente, os genes *ddl<sub>E. faecium</sub>* e *ddl<sub>E. faecalis</sub>*, ( DUTKA-MALEN et al., 1995).

Cada reação (25 µl) foi constituída por: 0,625 U de Taq Polimerase, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 2,0 mM MgCL<sub>2</sub>, tampão PCR 1x (20 mM Tris HCL, 50 mM KCL) e 25 pmol de cada *primer* ( DUTK-MALEN et al., 1995). As condições de amplificação foram: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min; seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 30 s; seguidos por um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min (DUTKN-MALEN et al., 1995). Foram utilizados como controle positivos as cepas, *E. faecium* ATCC 6569 e *E. faecalis* ATCC 29212 .

As reações foram processadas em Termociclador Mastercycler epgradients (*Eppendorf*). Os produtos amplificados foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%, comparando os fragmentos com um marcador de peso molecular 100bp.

**Tabela 2.** Primers e condições de anelamento utilizados na PCR de isolados de enterococos para os genes *ddl<sub>E. faecium</sub>* e *ddl<sub>E. faecalis</sub>*.

Gene e primer	Seqüência (5' – 3')	Produto	Temperatura de anelamento (°C)
<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>			
F1	GCAAGGCTTCTTAGAGA	550	54
F2	CATCGTGTAAGCTAACTTC		
<i>ddl<sub>E. faecalis</sub></i>			
E1	ATCAAGTACAGTTAGTCT	941	54
E2	ACGATTCAAAGCTAACTG		

#### 4.2.7 Avaliação da produção de gelatinase e atividade hemolítica

O potencial fenotípico de virulência dos isolados de enterococos foi avaliado por meio dos testes de gelatinase e atividade hemolítica (BROLAZO, 2003)

Os isolados foram inoculados, na superfície de ágar BHI (Biobrás) suplementado com 5% de hemácias de carneiro desfibriladas e incubadas a 37°C /48h. A formação de halos de hemólise ao redor das colônias era indicativa de reação positiva.

Para avaliação da gelatinase, os isolados foram inoculados em ágar gelatina nutriente (Difco) e incubadas a 30°C / 5 dias. A liquefação do meio era indicativa de reação positiva para gelatinase.

#### 4.2.8 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* foram testados pelo método de disco-difusão em ágar, conforme metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

Após a incubação em caldo BHI a 35°C/24h e com o auxílio do aparelho Densimat (*Biomerieux*), a turbidez de cada suspensão de cultura foi ajustada em solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica equivalente ao tubo 0,5 de McFarland.

As suspensões ajustadas foram inoculadas em placas de ágar Mueller-Hinton através de um *swab* de algodão estéril. Os discos de antimicrobianos (*Tabela 4*) foram então colocados na superfície das placas semeadas, distribuídos por igual. As placas foram incubadas a 35°C por 18 a 24h. O diâmetro do halo de inibição ao redor de cada disco foi mensurado com um paquímetro em mm.

*E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizado como controle. A interpretação dos resultados foi realizada conforme os critérios apresentados na *Tabela 3*.

**Tabela 3.** Padrão de interpretação dos diâmetros dos halos de identificação de inibição do crescimento de *Enterococcus spp.*

Antimicrobiano	Concentração do disco (µg)	R <sup>a</sup>	I <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>
		Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da zona (mm)
Vancomicina	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Teicoplanina	30	≤ 10	11-13	≥ 14
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Cloranfenical	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Eritromocina	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Ampicilina	10	≤ 16	-	≥ 17
Gentamicina	120	6	7-9	≥ 10

Fonte: NCCLS (2005) <sup>a</sup> Resistente; <sup>b</sup> Intermediário; <sup>c</sup> Sensível

#### 4.2.9 Determinação de atividade antimicrobiana

Cinquenta e seis isolados de *E. faecium* identificados por PCR, selecionados (média de 2 a 3 isolados por amostra de cada coleta), foram testados para determinação do espectro de atividade antimicrobiana frente aos microrganismos patogênicos.

As culturas de *E. faecium* foram mantidas a 4°C em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS). Os microrganismos patogênicos avaliados, provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ), foram: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, conforme descrito na *Tabela 4*. Estas culturas foram mantidas a 4°C em ágar inclinado: *Listeria monocytogenes* em ágar tripticase de soja (Difco) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), *S. aureus* em infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) e *B. cereus* em ágar tripticase de soja (TSA).

Para a realização dos testes, as culturas foram cultivadas duas vezes em meio de cultivo adequado para cada espécie e inoculadas de acordo com as condições de desenvolvimento apresentadas na *Tabela 4*.

**Tabela 4.** Descrição e condições de desenvolvimento dos microrganismos patogênicos.

Microrganismos	Linhagem	Origem	Condições de desenvolvimento
<i>Listeria monocytogenes</i>	C1 <sup>4</sup> 012	Queijo Minas frescal	TSB-YE <sup>1</sup> 35°C/16h
	C1 021	Queijo Minas frescal	
	C1 026	Queijo de coalho	
	E1 <sup>4</sup> 008	Ricota	
	IOC <sup>2</sup> 1359	Queijo artesanal	
<i>Staphylococcus aureus</i>	C1 003	Queijo Minas frescal	TSB <sup>3</sup> 35°C/16h
	C1 009	Queijo Minas frescal	
	E1 082	Ricota	
	E1 090	Ricota	
<i>Bacillus cereus</i>	E1 049	Ricota	TSB 35°C/16h
	R1 <sup>4</sup> 070	Queijo Minas frescal	
	K1 <sup>4</sup> B040	Queijo Minas frescal	
	K1 B048	Queijo Minas frescal	

<sup>1</sup> TSB-YE : Caldo tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura;

<sup>2</sup> IOC : Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro –RJ;

<sup>3</sup> TSB : Caldo tripticase de soja;

<sup>4</sup> C1, E1, R1 e K1 : Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP.

A sensibilidade dos microrganismos patogênicos foi avaliada pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços adaptados de Tagg e Mcgivem (1971). Foi utilizado ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura semi-sólido (0,9% ágar) inoculado com 1% ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/ml) dos cultivos das linhagens de *L. monocytogenes* e ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA) semisólido (0,9%) previamente inoculado com 1% ( $10^6$  -  $10^7$  UFC/ml) dos cultivos e *B. cereus* e *S. aureus* (Sigma, St Louis, EUA) (KOJIC et al., 1991).

Em cada placa, contendo os ágares semi-sólidos previamente inoculados com patógenos, foram feitos sete orifícios de 5 mm, onde foram depositados alíquotas de 50 µl dos sobrenadantes das culturas de *E. faecium*.

Após incubação das placas a 35°C por 24h, foi avaliada a presença de halos de inibição ao redor dos orifícios.

Os sobrenadantes das culturas de *E. faecium* em MRS a 35°C/24h foram obtidos por centrifugação (7500g/15min a 4°C) (centrifuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA). Em seguida, o pH destes foi corrigido para 6,5 com NaOH 1 N (Merck, Darmstadt, Alemanha) e então os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) ( MORENO, 1995).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de queijo Serra da Canastra

Os resultados da avaliação dos parâmetros microbiológicos das amostras individuais do queijo Serra da Canastra, segundo a RDC 12/01, estão apresentados na *Tabela A.1* do Apêndice A.

**Tabela 5.** Adequação das amostras do queijo Serra da Canastra com os padrões legais da RDC 12/01 da ANVISA.

Parâmetros	Padrões RDC 12/01*	Nº de amostras de acordo
Coliformes termotolerantes	$5 \times 10^3$	27 (100%)
Estafilococos coagulase positiva	$10^3$ UFC/g	25 (92,5%)
<i>Salmonella</i>	Ausência /25g	27 (100%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência /25g	27 (100%)
<i>Bacillus cereus</i>	$5 \times 10^2$ UFC/g (sobremesas lácteas)	27 (100%)
	$5 \times 10^3$ UFC/g (leite em pó)	
Total de amostras		27

\* Resolução RDC nº 12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001 (limite máximo estabelecido)

Pela análise dos resultados da determinação de coliformes termotolerantes observou-se que 70,4% (19/27) das amostras apresentaram valores não detectáveis (<3 NMP/g). Por sua vez, 29,6% (8/27) apresentaram valores entre 7 e 210 NMP/g, ainda de acordo com o limite legal ( $5 \times 10^3$ ).

No Brasil, diversos trabalhos têm revelado a baixa qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em diferentes regiões,

caracterizados pela freqüente contaminação por coliformes termotolerantes (PEREIRA et al., 1987; SABIONI et al., 1988; RODRIGUES et al., 1995; CARVALHO et al., 1996; LIMA et al., 1996).

Borelli (2002), em um estudo realizado com 10 amostras de queijo Canastra, observou que todos apresentaram contagens de coliformes totais e termotolerantes acima dos limites máximos permitidos pela legislação vigente.

Neste trabalho, como pode ser observado na *Tabela 5*, com relação a contaminação por coliformes termotolerantes nenhuma das amostras do queijo Serra da Canastra apresentou contagens acima dos tolerados estabelecidos pela RDC nº. 12/2001 (ANVISA, 2001). Estes resultados se assemelham aos relatados por Pereira (2008), que avaliou tanto queijos Canastra da região de São Roque de Minas (MG) como sua matéria prima e obteve resultados para coliformes termotolerantes dentro dos padrões da legislação para todas as amostras.

No trabalho de Pereira (2008), em fermentos endógenos (“pingo”), comumente empregados no processamento de queijo Canastra, também foram observados valores de coliformes termotolerantes relativamente baixos  $< 3$  NMP/ ml<sup>-1</sup> a  $1,5 \times 10^1$  NMP/ ml<sup>-1</sup>.

Pesquisas desenvolvidas por Nóbrega (2007) e Pimentel Filho et al., (2005) analisando fermentos endógenos para fabricação do queijos Serra da Canastra e Minas artesanal do Alto Paraíba, relataram valores para coliformes a 30°C e *E. coli* que variaram de  $1,0 \times 10^1$  UFC. ml<sup>-1</sup> a  $4,1 \times 10^3$ .

Neste trabalho, estafilococos coagulase positiva foram observados em 22,2% (6/27) das amostras analisadas, com contagens variando de  $1,5 \times 10^1$  a  $2,1 \times 10^3$  e 7,4% (2/27) delas com valores acima do limite estabelecido pela legislação ( $10^3$  UFC/g), resultados semelhantes foram observados por Nóbrega (2007) com o queijo Canastra e por Pimentel Filho et al., (2005) com o fermento endógeno do Alto da Parnaíba.

Para os valores determinados para *B. cereus*, verificou-se que 11,11% (3) das amostras do queijo Canastra apresentaram contagem de  $1,5 \times 10^2$  a  $2,0 \times 10^2$  UFC/g.

Embora *Bacillus cereus* não esteja relacionado como parâmetro microbiológico pela RDC nº 12/2001 para queijos de alta umidade, no entanto, no setor laticinista este microrganismo também é alvo de pesquisa, dada a sua resistência à pasteurização e propriedades deteriorantes sobre o leite

(ANDERSSON et al., 1995). Na literatura são encontradas poucas pesquisas relacionadas à ocorrência de *B. cereus* em queijo fresco e sua participação em biofilmes formados nas superfícies de equipamentos e instalações de processamento do produto. Na literatura apenas um relato de ocorrência de enfermidade de origem alimentar em 1967 no Canadá, citado por Schmitt et al., (1976) ocorrido com queijo Feta, onde uma pessoa foi acometida de síndrome emética.

Resende-Lago et al., (2007) pesquisaram a presença de *Bacillus cereus* em 120 amostras de diversos tipos de leite, sendo isolado e identificado em 22 (73,3%), 15 (50,0%), 29 (96,7%) e 4 (13,3%) amostras de leite em pó, cru, pasteurizado e UHT (longa vida), respectivamente.

Esper (2006) avaliou a qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP, relatou que 51,1% das amostras estavam contaminadas por *B. cereus* sendo que 28,9% com contagens na faixa de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g.

Estudo realizado por Cardoso (2000) revelou a presença do *B. cereus* em 48,3% de 240 amostras de leite A, B, e C analisados. As contagens foram baixas, na faixa de  $10^2$  UFC/ml, com maior concentração no leite tipo C.

A sobrevivência de *B. cereus* em queijo Gouda foi pesquisada por Rukure e Bester (2001) onde se inoculou o microrganismo, chegando a concentrações de  $10^2$  no leite utilizado. Após a salga do queijo não foi detectado *B. cereus* nas amostras. O autor sugere a baixa atividade de água ( $A_w$ ), baixo potencial de óxido-redução, alto teor de sal e a depletação da lactose combinados com a acidez característica deste queijo como fatores que inviabilizam a sobrevivência da bactéria. Neste trabalho não foi avaliado a presença de esporos.

A presença de *Salmonella* nas amostras analisadas do queijo Serra da Canastra não foi detectada em nenhuma das 27 amostras. A ausência de salmonelas em diversos tipos de queijos também foi observada por diversos pesquisadores Salotti et al., (2006); Dionizio et al., (2003); Pereira (1999).

A ANVISA estabelece ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra de queijo de alta e muita alta umidade e neste trabalho todas as amostras do queijo Serra da Canastra apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Peresi et al., (2001); Salotti et al., (2006) e Nóbrega (2007).

A técnica de fabricação do queijo Minas artesanal foi registrada no Livro dos Saberes, em agosto de 2002, como primeiro patrimônio imaterial de Minas Gerais pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais – IEPHA/MG. Portanto, são fundamentais os projetos de apoio técnico que vêm sendo desenvolvido pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER/MG), Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), visando à melhoria da qualidade e segurança alimentar desse produto ao consumidor. A implementação das Boas Práticas de Fabricação na produção dos queijos artesanais tem como objetivo prevenir contaminações neste alimento. Este método, que é embasado em princípios técnicos e científicos, possibilita um controle da produção dos queijos desde a obtenção da matéria-prima até o consumidor final (BORELLI, 2006a).

A orientação aos produtores e a implementação das Boas Práticas de Fabricação na produção do queijo Serra da Canastra, possivelmente promoveu resultados positivos quanto à qualidade higiênico-sanitária, sendo evidenciada neste trabalho.

## 5.2 Avaliação de bactérias do gênero *Enterococcus*

Nas amostras de queijo Serra da Canastra foram observadas contagens variando entre  $10^4$  a  $10^7$  UFC/g de bactérias do gênero *Enterococcus* ficando evidenciado que este gênero compõe a microbiota láctica presente na produção deste queijo. Na *Tabela 6* é apresentada a distribuição das amostras em função das faixas de variação das contagens de colônias presuntivas de Enterococos no ágar KF *Streptococcus* (Difco).

**Tabela 6.** Distribuição das amostras em função das faixas de variação das contagens de colônias presuntivas de Enterococos

Contagem microbiana (UFC/g)	Amostras com colônias características* (%)
$10^4$	23,5%
$10^5$ - $10^6$	66,2%
$10^7$	10,7%

\* Colônias vermelho-escuras

Resultados semelhantes foram observados por Borelli (2006c) e Nóbrega (2007), em pesquisa realizada para caracterização das bactérias lácticas durante a fabricação do queijo Minas produzido na Serra da Canastra.

Carvalho et al., (2005) isolando e identificando bactérias lácticas presentes em queijos de coalho artesanais, verificaram que de um total de 331 isolados, 270 foram identificados como bactérias lácticas sendo 60,3% caracterizadas como gênero *Enterococcus*.

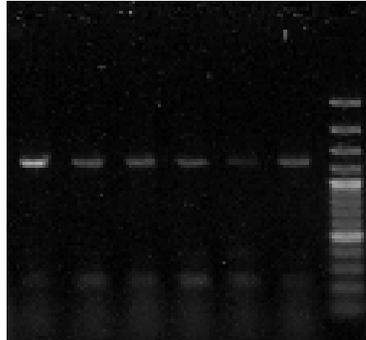
Em alguns queijos, como Cebreiro, Kefalotyri, Manchego, Picante da Beira Baixa e Teleme, os enterococos são microrganismos predominantes durante toda a maturação do produto (FRANZ et al., 1999).

De um total de 181 isolados com características de enterococos, das amostras do queijo Serra da Canastra, 81,2% (147/181) foram confirmados para o gênero através dos testes : coloração de Gram, catalase, crescimento em pH 9,6 e em temperatura 45°C e 10°C e crescimento na presença de bile com hidrólise da esculina (*Tabela 7*). Esses isolados confirmados foram submetidos às análises moleculares (PCR), testes fenotípicos de virulência (gelatinase e hemólise) e de sensibilidade a antimicrobianos.

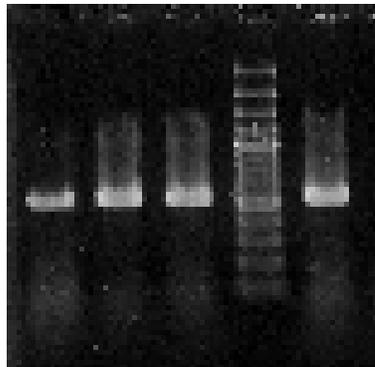
Os resultados das análises bioquímicas para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* dos isolados das amostras do queijo Serra da Canastra por data de coleta, estão apresentados nas *Tabelas B1, B2, B3, B4 e B5* do Apêndice B.

Do total de isolados confirmados, vinte e seis (17,6%) apresentaram resultados negativos frente à pesquisa dos genes de identificação de espécie *ddlE. faecium* e *ddlE. faecalis*, embora tenham apresentado resultados característicos de enterococos frente aos testes de confirmação de gênero, resultados estes que indicam a presença de outras espécies de enterococos.

Cento e vinte e um isolados (82,3%) foram identificados como *E. faecium* através da PCR. Nenhum *E. faecalis* foi identificado entre os isolados analisados. (*Figuras 1 e 2*). De modo geral, esta espécie é a predominante entre enterococos isolados de amostras de laticínio, particularmente de queijo. Resultados semelhantes foram apresentados por pesquisadores sobre a prevalência de *E. faecium* em amostras de alimento (CARIOLATO et al., 2008; GOMES et al., 2008; CAVALCANTE et al., 2007).



**Figura 1:** Gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécie. Canaleta 7: marcador molecular (100 pb); 1 a 6: *E. faecalis* ATCC 29212 positivo para o gene *ddl* *E. faecalis* (941 pb).



**Figura 2:** Gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de espécie. Canaleta 4: marcador molecular (100 pb); 1 a 3: *E. faecium* isolados de amostras de queijo positivos para o gene *ddl* *E. faecium* (550 pb); 5: *E. faecium* ATCC 6569 positivo para o gene *ddl* *E. faecium* (550 pb).

**Tabela 7.** Resultados de testes bioquímicos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR

Testes	Nº Total Isolados	Nº Positivo	% Positivo
Confirmação do gênero <sup>1</sup>	181	147	81,2%
PCR de <i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	147	121	82,3%
PCR de <i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	147	0	0

<sup>1</sup> Confirmação de gênero (gram positivas, catalase-negativas, capazes de apresentar crescimento em pH 9,6, e em temperatura 45°C e 10°C e crescimento na presença de bile com hidrólise da esculina)

### 5.3 Avaliação de fatores de virulência

Nas análises fenotípicas do potencial de virulência, apenas dois isolados (1,4%) apresentaram resultados positivos no teste de gelatinase (*Tabela 8*). Estes isolados apresentaram resultados negativos na investigação para presença dos genes de identificação de espécie realizadas através da PCR, portanto tratam-se de outras espécies que não *E. faecium* e *E. faecalis*.

Para o teste de hemólise, nenhum dos isolados apresentaram resultados positivos (*Tabelas C1 e C2* do Apêndice C).

Os mecanismos da patogenia dos enterococos ainda não estão bem esclarecidos, pouco se sabe sobre a virulência de *E. faecium*, porém alguns pesquisadores reportam a presença de genes de fatores de virulência como *esp*, *hyl<sub>efm</sub>* e *acm* (NALLAPAREDY et al., 2003; RICE et al., 2003; LEAVIS et al., 2004).

Eaton e Gasson (2001), Mannu et al., (2003) e Cariolato et al., (2008) relatam que fatores de virulência ocorrem com maior frequência em *E. faecalis* geralmente, *E. faecium* são livres de fatores de virulência.

A gelatinase é um fator de virulência que tem sido muito estudado em *E. faecalis* e sabe-se que a gelatinase não é produzida por todos os enterococos isolados de humanos. Elsner, (2000) isolou cepas de amostras sanguíneas e relatam que 55% dos *E. faecalis* eram produtores de gelatinase e enquanto linhagens de *E. faecium* eram negativas. Associado a este fator, Dupre et al., (2003) também estudaram 32 isolados de *E. faecium* e não encontraram o gene em nenhuma delas. Eaton & Gasson (2001), estudaram 6 isolados de *E. faecium* de startes de queijo, 11 isolados de alimento e 9 de origem humana e nenhum deles apresentou a degradação da gelatina em placas de ágar gelatina. Camargo (2005), analisando fatores de virulência em *Enterococcus sp.* isolados no Brasil obteve como resultado, somente uma amostra (*E. faecium* VREFM 17) das 146 analisadas apresentou degradação da gelatina *in vitro.*,

Ferreira (2005) em uma triagem com 352 cepas de *Enterococcus ssp.* de amostras de fezes humanas para detecção de atividade antimicrobiana realizou a análise de fatores de virulência, e todas as espécies de *E. faecium* e *E. faecalis* avaliadas não apresentaram resultado positivo para o teste de hemólise e gelatinase, resultado este semelhante ao obtido por Nascimento (2007).

Estudos genéticos determinaram que as atividades hemolíticas e antimicrobiana são produzidas pela mesma substância, a citolisina, que é considerada como um fator de virulência em cepas de enterococos (BOOTH,1996). Entretanto, em estudos realizados quanto a atividades hemolíticas em cepas de *Enterococcus ssp.*, isoladas de alimentos e amostras clínicas, foram encontradas 8 cepas de *E. faecalis* que apresentavam  $\beta$ -hemólise em sangue humano, estas cepas também apresentavam o gene estrutural da citolisina, já nos isolados de *E. faecium* positivos para  $\beta$ -hemólise não foi verificada a presença do gene da citolisina (DE VUYST et al., 2003).

A frequência da ocorrência destes fatores parece estar parcialmente associada à espécie e a origem do isolado. Esta frequência é provavelmente maior em enterococos isolados de amostras clínicas quando comparada à observada em isolados de amostras ambientais, de alimentos e em culturas iniciadoras (*starter*) utilizadas na indústria de alimentos (EATON e GASSON, 2001).

**Tabela 8.** Análise fenotípica de fatores de virulência de isolados\* de enterococos de amostras de queijo Serra da Canastra

Testes fenotípicos	Nº Total de isolado	Nº isolado positivos (%)
Gelatinase	147	2 (1,4)
Hemólise	147	0

\* Teste de confirmação de gênero (gram positivas, catalase-negativas, capazes de apresentar crescimento em pH 9,6, e em temperatura 45°C e 10°C e crescimento na presença de bile com hidrólise da esculina)

#### 5.4 Sensibilidade a antimicrobianos

Os perfis de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* avaliados são apresentados na *Tabela 9*.

Na pesquisa realizada entre os isolados confirmados como *Enterococcus*, 20,4% dos isolados (30/147) apresentaram perfil de resistência a vancomicina.

Entre os isolados identificados como *E. faecium*, 47,9% (58/121) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, 29,7% isolados (36/121) apresentaram resistência a um, dois ou três dos antimicrobianos testados; 12,4% dos isolados (15/121) apresentaram resistência a quatro ou cinco antimicrobianos e 5,0% dos isolados (6/121) apresentaram resistência a seis antimicrobianos. Apenas um isolado apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados (*Tabela 10*). Entre os 26 isolados cuja espécie não foi identificada, 13 apresentaram resistência, sendo que 6 foram resistentes a cinco ou seis antimicrobianos testados (dados não mostrados)

**Tabela 9.** Perfil de sensibilidade a antimicrobianos segundo o método de disco-fusão em ágar de isolados de *Enterococcus* \* obtidos de amostras de queijo Serra da Canastra.

Antimicrobiano	Total =147		
	Resistente (%)	Intermediário (%)	Sensível (%)
Vancomicina 30 µg	30 (20,4)	15 (10,2)	102 (69,4)
Gentamicina 120 µg	10 (6,8)	19 (12,9)	118 (80,3)
Clorofenical 30 µg	14 (9,5)	24 (16,3)	109 (74,2)
Eritromicina 15 µg	15 (10,2)	94 (63,9)	38 (25,9)
Ampicilina 10 µg	29 (19,7)	-	118 (80,3)
Teicoplamina 30 µg	17 (11,6)	30 (20,4)	100 (68)
Tetraciclina 30 µg	57 (38,8)	44 (29,3)	46 (31,3)

\* Cocos gram positivos, catalase negativa, multiplicação em caldo BHI contendo 6.5% de NaCl, em caldo BHI pH 9,6 em caldo BHI a 45°C e 10°C, crescimento na presença de bile com hidrólise da esculina.

**Tabela 10.** Perfil de resistência a antimicrobianos apresentado por *Enterococcus faecium* obtidos de amostras de queijo Serra da Canastra.

Número do isolado	Perfil de resistência *
71, 91	Clor
138, 159	Van
1, 64, 66, 70, 109, 114, 115, 130, 132, 134, 140 143, 144, 149, 176	Tet
146	Clor, Eri
125, 141, 145	Clor, Test
108, 147	Eri, Tet
151	Amp, Tet
148	Van, Clor, Tet
157	Van, Eri, Tet
164, 180	Eri, Amp, Tet
118, 119, 123, 131, 135, 169	Clor, Eri, Tet
121	Clor, Eri, Tic, Tet
105, 120, 137	Clor, Eri, Amp, Tet
181	Gent, Clor, Eri, Tet
174	Van, Gent, Eri, Tet
158	Van, Gent, Clor, Amp, Tet
171, 178	Clor, Eri, Amp, Teic, Tet
153, 156, 166, 167, 168, 179	Van, Clor, Eri, Amp, Tet
162, 163	Van, Gent, Clor, Eri, Teic, Tet
152, 170, 172, 173	Van, Clor, Eri, Amp, Teic, Tet
164	Van, Gent, Clor, Eri, Amp, Teic, Tet

\* Resistência definida conforme NCCLS (2005)

Van: vancomicina 30 µg, Gent: gentamicina 120 µg, Clor: cloranfenicol 30 µg, Eri: eritromicina 15 µg, Amp: ampicilina 10 µg, Teic: teicoplanina 30 µg, Tet: tetraciclina 30 µg

Nas últimas décadas, a resistência a drogas entre os cocos Gram positivos tem aumentado (HERSHBERGER et al., 2003). A emergência de enterococos multirresistente é um terrível desafio à terapia. Pesquisas apontam à ocorrência de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos, incluindo cepas resistentes à vancomicina pela primeira vez relatada em 1988, em diferentes alimentos e com resistência variáveis (PÉRES-PULIDO et al., 2006; MAIETTI et al., 2007; SCHOUTEN et al., 2000).

Desde então, resistência à teicoplanina e/ou vancomicina começou a aparecer em todo o mundo. *Enterococcus* resistente a vancomicina frequentemente expressa resistência adicional a múltiplos antibióticos, incluindo ampicilina e aminoglicosídeos, incluindo resistência a altos níveis de gentamicina e estreptomicina (SCHOUTEN et al., 2000).

Tauber et al., (1999), relatam diferentes níveis de resistência a antimicrobianos (penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, lincomicina, rifampicina, ácido fusídico e vancomicina) em enterococos isolados, além de cepas com resistência às drogas testadas.

A incidência de enterococos isolados de pacientes em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) em vários países foi relatada recentemente por Jones et al., (2004) em um estudo sobre resistência emergente entre patógenos bacterianos em UTIs utilizando dados de estudo de vigilância Norte Americano e Europeu. Entre as amostras dos EUA, *Enterococcus sp.* aparece em sexto lugar representando 5,4% dos patógenos isolados e, especificamente, *E. faecalis* está em oitavo lugar com a incidência de 3,7% do total de bactérias isoladas. Entre os *E. faecalis* dos EUA, 1,2% foram resistentes à ampicilina, 4,5% à vancomicina e 34,8% são resistentes a altos níveis de gentamicina. Entre os *E. faecium*, 90,3% são resistentes à penicilina, 76,3% são resistentes à vancomicina e 42,5% são resistentes a altos níveis de gentamicina.

No Canadá a incidência de enterococos isolados de pacientes em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) revelou que, 14,5% das amostras de *E. faecium* são resistentes à vancomicina, 82,8% são resistentes à ampicilina e 40,5% são resistentes a altos níveis de gentamicina. Na França, esta mesma pesquisa, relatou que entre os *E. faecium*, 49,7% são resistentes à ampicilina, 0,8% resistentes à vancomicina e 12,2% resistentes a altos níveis de gentamicina. Enquanto que na Alemanha, entre os isolados de *E. faecium*, 87,7% são resistentes à altos níveis de gentamicina (JONES et al., 2004).

No Brasil, Furtado et al.,(2005) demonstraram a incidência progressiva de *Enterococcus* resistentes a vancomicina em um hospital da cidade de São Paulo de 2000 a 2002, com os seguintes dados: 9,5% das amostras de *Enterococcus sp.* eram resistentes a vancomicina em 2000, o valor em 2001 aumentou para 14,7% para 15,8% em 2002, revelando que no Brasil o problema é ainda crescente.

Gomes et al., (2008) sugerem que a disseminação de cepas resistentes a antibióticos possa estar relacionada à ingestão de alimentos. Este quadro parece ser relevante, visto a importância deste antimicrobiano no tratamento clínico de doenças nosocomiais.

## 5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana frente à patógenos isolados de alimentos

Nenhum dos cinqüenta e seis isolados de enterococos testados (100%) levaram a formação de halo de inibição nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. aureus*. (Tabela 11). Os resultados individuais de cada isolado de *E. faecium* frente à patógenos são encontrados nas Tabelas D1, D2 e D3 do Apêndice D.

**Tabela 11.** Espectro antimicrobiano de *Enterococcus faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a patógenos.

Microrganismos Teste <sup>1</sup>	Halo de inibição <sup>2</sup> de <i>E. faecium</i> isolados* de queijo Serra da Canastra
<i>Listeria monocytogenes</i>	
IOC 1359	0
E1 008	0
C1 012	0
C1 021	0
C1 026	0
<i>Bacillus. cereus</i>	
K1 B040	0
K1B 048	0
E1 049	0
R1 070	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	
E1 082	0
E1 090	0
C1 003	0
C1 009	0

<sup>1</sup> Microrganismos patogênicos, provenientes da coleção de Culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ)

<sup>2</sup> Halo de inibição em milímetro de diâmetro

\* N° de isolados= 56

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo decréscimo ou inativação da atividade de bacteriocina com o decorrer do tempo, como, agregação às proteínas, degradação proteolítica e adsorção à célula produtora (DE VUYST e VANDAMME, 1992).

A produção de bacteriocinas é um processo dependente do crescimento e da atividade fisiológica da bactéria produtora (LEROY e De VUYST, 2002; YANG e RAY, 1994), o que faz com que a quantidade de bacteriocina formada no meio seja correlacionada com a biomassa produzida.

Do ponto de vista ecológico pode-se sugerir que o crescimento das células ao atingir um alto número, diminui a necessidade da produção de metabólitos de defesa. Quanto à população percebe que determinada concentração de células foi alcançada, a produção de bacteriocinas pode ser inibida (LEROY e DE VUYST, 2002).

O baixo pH, altas concentrações de sal ou etanol afetam adversamente o crescimento e a produção de bacteriocinas. Na presença de 6,5% de NaCl ou 7% de etanol, nenhuma produção de bacteriocina pode ser detectada (NILSEN et al., 1998).

Alguns fatores podem contribuir para aumentar a resistência das células às bacteriocinas. A composição e a estrutura da parede da membrana celular ou a presença de protease junto à célula alvo podem fazer com que a bacteriocina seja fisicamente incapaz de atingir o alvo, de outra forma, certos componentes celulares (receptores) que são essenciais para a ligação da bacteriocina, podem estar mutados (EIJNSINK, 2002).

Estudos realizados com *Enterococcus spp*, proveniente de diversas origens, apresentam um maior número de cepas produtoras de bacteriocinas, do que os resultados obtidos em trabalhos realizados com isolados provenientes apenas de alimentos (DU TOIT et al., 200; DEL CAMPO ; 2001; DE VUYST et al., 2003).

Franz et al., (1996) avaliando o espectro de ação antimicrobiano de *E. faecium* BFE 900, demonstraram sensibilidade de *L. monocytogenes* à bacteriocina, contudo *B. cereus*, *S. aureus* e *Lc. lactis* não foram inibidos.

Em 1998, Ennahar e colaboradores, analisaram o espectro de ação de *E. faecium* WHE 81. As cepas de *S. aureus* e *B. cereus* não demonstraram sensibilidade à enterocinas, somente *L. monocytogenes* apresentou halo de inibição entre 2 e 4 mm.

Ennahar e Deschamps (2000) avaliando a atividade antimicrobiana de enterocina produzidas por *E. faecium* EFM 01 frente a isolados de patógenos, observou que nenhuma das sete linhagens de *S. aureus* avaliadas foi inibida, das 14 cepas de *L.monocytogenes*, 13 apresentaram halo de inibição.

Jennes et al., (2000) em estudo realizado com 77 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas do trato gastrintestinal de avestruz, entre elas *Enterococcus* e *Lactobacillus*, relataram que apenas 3 (4%) apresentaram atividade antimicrobiana no sobrenadante livre de células.

Prado et al., (2000) avaliando a atividade antimicrobiana de 336 isolados de bactérias lácticas do gênero lactobacilos de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*, relataram que um total de oito cepas apresentaram atividade antimicrobiana indireta a pelo menos um dos microrganismos utilizados.

No trabalho de Sabia et al., (2000) apenas 7,6% das cepas de *Enterococcus spp.*, isolados de salame, apresentaram atividade antimicrobiana contra microrganismos taxonomicamente relacionados. Na pesquisa realizada por De Vuyst et al., (2002), dos 426 isolados selecionados na triagem, foram preparados sobrenadantes livres de células e testados contra 52 bactérias indicadoras. Destes somente 14% das cepas apresentaram atividade antimicrobiana. Neto et al., (2005) estudando a atividade antagonista de bactérias ácido-lática isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial, observou que os isolados de *Lactococcus lactis* e *Lactococcus raffinolactis* não atuou frente a *Salmonella entérica sorovar, Typhimurium, Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*.

Ferreira (2005) analisando enterocinas produzidas por cepas de *Enterococcus spp.*, provenientes de amostras de água, fezes de humanos e fezes de suínos, observou que apenas 5% das 352 cepas testadas apresentaram atividade antimicrobiana e das 82 cepas de *E. faecium* testadas nenhuma destas apresentou atividade inibitória no sobrenadante livre de células. Apenas duas cepas de *Salmonella* Enteritidis e quatro de *Listeria* foram sensíveis ao sobrenadante livre de células, já a *Salmonella* Typhimurium, quatro espécies de *Bacillus* e quatro espécies de *Staphylococcus* não foram inibidas.

Alvaro e outros (2005) estudando o espectro antimicrobiano de *E. faecium* VQ 31 observaram que a bacteriocina produzida por esta espécie não foi capaz de inibir *B. cereus* e *Lc. lactis*.

Nascimento (2007) na avaliação do espectro de ação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços, observou que as bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198

apresentaram atividade inibitória apenas sobre linhagens de *Listeria monocytogenes*, não inibindo as culturas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Muitos estudos indicam redução da contagem do microrganismo alvo entre 1 e 3 ciclos logaritmos imediatamente após a adição de uma bacteriocina, não sendo observado mais nenhum efeito após este período. Este fenômeno pode estar relacionado a uma quantidade insuficiente de bacteriocina para inibir todas as células do microrganismo alvo, dando aparência de resistência. As células sobreviventes podem, portanto, continuar seu desenvolvimento, com taxa de crescimento próximo a da amostra controle, porém com menor contagem microbiana (MURIANA, 1996).

## 6. Conclusões

Considerando os resultados obtidos:

- O baixo índice (7,3%) de amostras de queijo Serra da Canastra em desacordo com os padrões microbiológicos legais, pode estar associado às diversas ações desenvolvidas para melhoria da qualidade do queijo Minas artesanal, e particularmente na região da Serra da Canastra;
- a espécie *Enterococcus faecium* predomina entre os isolados de *Enterococcus* das amostras analisadas do queijo Serra da Canastra; que por sua vez não indicaram a presença de fatores de virulência através dos testes de gelatinase e hemólise;
- a considerável distribuição de resistência a antimicrobianos observada para os perfis de sensibilidade entre os *Enterococcus* isolados do queijo Serra da Canastra deve ser motivo de atenção por parte da comunidade científica e autoridades no sentido de aprofundar os conhecimentos visando o consumo seguro destes alimentos e evitando a propagação das mesmas para o ambiente hospitalar;
- a resposta negativa de todas as cepas de *E. faecium* utilizadas no teste de atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* revelam a sua menor utilidade enquanto agente protetor, em contraposição aos benefícios tecnológicos inerentes.

## 7. Referências Bibliográficas

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 169 – 185, 1995.

ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different food borne pathogens to fermentation. **Food Control**, V.8, p. 227 – 239, 1997

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo Minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p. 424 – 428,2002.

ALVARO, C.; GARCIA-ALMEIDA, B. E.; MARTIN, S. E. REGALADO, C. Anti-*listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substance from *Enterococcus faecium* UQ 31 isolated from artisan Mexican-style cheese. **Current Microbiology**, v. 51, p. 110-115, 2005.

ANDERSSON, A., RONNER, U.; GRANUM, P.E. What problems does the food industry have with the spore – forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p. 145 – 155, 1995.

ANDREWS, H. W.; FLOWERS, R. S.; SILIKERS, J.; BAILEY, S. J. *Salmonella*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4° ed. Washington: APHA, Chap.37, p.357-380, 2001

ANUNCIÇÃO, L. L. C.; LINARDI, W. R.; CAMARGO, L. S. Production of Staphylococcal Enterotoxin A in cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.5, n.1, p. 68 – 71, 1994.

ASCOM/EMATER-MG. Queijo da Serra da Canastra recebe certificação.  
Disponível em : <http://www.agroline.com.br/agronoticias>. Acesso em 15 agost.  
2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJO (ABIQ). **Produção de queijo no Brasil**. 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16° ed. Washington, 1995.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In:  
SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. (eds) **Lactic acid bacteria**. New York:  
Marcel Dekker, p.1-63, 1993.

BALLESTEROS, C.; POVEDA, J. M.; GONZALEZ-VIÑAS, M.A.; CABEZAS, L.  
Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and  
industrial manchego cheese. **Food Control**, v. 17, p.249-255, 2006.

BANWART, G. J. Basic Food Microbiogy. **AVI publ. company Westport, Conn.** USA, 1979.

BANWART, G.J. Basic food microbiology. Zed. New York : **Chapman & Hall**,  
773 p, 1989.

BAUMGARTNER, A.; KUEFFER, M.; ROHNER, P. Occurrence and antibiotic  
resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. **Archives Lebensmittel Hyg**, v. 52, p. 16-19, 2001.

BARNBY-SMITH, F. M. Bacteriocins: applications in food preservation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, n. 6, p. 133-136, 1992.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus* In: UNITED STATES. **Food and Drugs Administration Bacteriological Manual**, 8° ed ,  
2001. Cap 12.

BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>o</sup> ed. Washington: APHA,. Chap. 32, p.311- 316, 2001.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In : Doyle, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**, New York. p. 463 – 523, 1989.

BINTSIS, T.; PAPADERMAS, P. Microbiological quality of white-brined cheese: **A Review. International Journal of Dairy technology**, v.55, 2002.

BORELLI, B. M., **Quantificação dos Indicadores Higiênico - Sanitários e da Diversidades de Leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra, MG**. 2003. 107p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BORELLI, M. B. Dossiê técnico. Melhoria da qualidade do queijo Minas artesanal. **Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/ CETEC** 2006 a.

BORELLI, M. B.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R.S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus spp*. And other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2006 b, v. 37, p. 545-550.

BORELLI, B. M. Caracterização das bactérias láticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo curado produzido na Serra da Canastra-MG. Belo Horizonte:UFMG. 2006. 119p. Tese ( Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

BORGEN, K.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFIORD, A.; WASTWSON, J.; OLSVIK, O.; KRUSE, H. Continuing high prevalence of vanA-type vancomycin-

resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 478-485, 2000.

BORGES, M. de F., BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Sobrevivência de *Salmonella* em queijos Minas Padronizado durante a maturação. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, V. 20, n.3, p. 276 – 281, 1990.

BOOTH, M. Strutral analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecali* *cytolysin*, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v.21, p.1175-1184, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Regulamento de Inspeção Industrial e sanitária de Produtos de Origem Animal**: MAPA, 1997.

BRASIL. Portaria n 146, de 07 de marco de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária**: Brasília, 50p, 1996.

BRASIL. Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária** : Brasília, 18p,2001.

BRITO, J. R. F. Matite bovina de A a Z. **Sanidade do gado leiteiro**.Coronel pacheco, MG. CNPGL-Embrapa,. p.7-14, 1995.

BRITISH COLUMBIA CENTER FOR DISEASE CONTROL BCCDC. **Milk safety notes**, 2002. Disponível em : <<http://www.bccdc.org/content.php?item=145>>. Acesso em: 7 out. 2007.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leite e derivados** . 2003. 98p. Dissertação de ( Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Camoinas, 2003.

BRUNO, M. E. C.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1993.

CABEZAS, L.; SANCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENÁ, S.; PALOP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal manchego cheese from two dairies. **Food Control**. v.18, p. 11-17, 2007.

CALLERWAERT, R.; HUGAS, M.; DE VUYST, L. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish- style dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, n.1/2, p.33 – 42, 2000.

CAMARGO, L. B. C. **Estudo dos fatores de virulência em Enterococcus sp.** 2005. 153p. Tese (Doutorado Biociências Aplicadas à Farmácia)- Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2005.

CAMARGO, L. S. Casos de intoxicação alimentar por toxinas estafilocócicas. In: **Seminário de Segurança dos Alimentos**. Vassouras, 2004. CD-Rom. Produzido por SENAI-RJ.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v.19: p.886-892, 2008.

CARDOSO, A. L. M. P. **Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas e psicrófilas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado.** Campinas, 2000. 95p. tese (Doutorado em Tecnologia de Alimento, Universidade Estadual de Campinas.

CARMO, L.S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M. J.; SANTOS, A.D.; FARIA, M.E.; PENA, E. C. Food **poisoning** due to enterotoxigenic strains of

*Staphylococcus* present in white cheese type Minas and raw milk, Minas Gerais State (Brazil). **Food Microbiology**, 2001.

CARVALHO, E. P.; MOCHEL, A. C. LEAL, D. D. M. et al.; **Qualidade do queijo Minas frescal comercializado em feiras livres**. In: Congresso Nacional de Laticínio, 14, Juiz de Fora, 1996. Anais, p.111-118, 1996.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R.T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N.M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza(CE). **Revista do Instituto de Laticínio Candido Tostes**, Juiz de Fora (MG). v. 60, p.221- 223, 2005.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijo tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas**, 2003, 107p. Tese (Mestre em tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimento, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínio, no Estado da Paraíba(Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, 27(1), jan.-mar. 2007.

CENTERS FOR DIASESE CONTROL AND PREVENTIO. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 50, n.26, p. 560 – 562, 2001.

CERRI, C., SOUZA, E. *Globo Rural*. V,17, p.36, 2002.

CHEN, Y. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles.

**Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4770-4777, 1997.

CHIKINDAS, M. L. Pediocin PA-1 a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3577-3584, 1993.

CINTAS, L. M. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel  $\text{sec}$ -dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4321-4330, 1997.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.1, p. 1 – 20, 2001.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADOR, B. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 409-421, 1997.

COLLEN, G. PEREIRA, M. L.; CARMO, L.S. et al.; **Avaliação microbiológica do leite tipo C e queijo tipo Minas comercializados em Belo Horizonte In:** Congresso Nacional de Laticínios, 7, Juiz de Fora, 1996, Anais, São Paulo, 1984.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

De BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MARINE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food – borne disease in France and in difference industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, p. 1 – 17, 2001.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Cerela**, n. 8, p. 38-43, 1997.

DESTRO, M.T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p. 110 – 112, 1991.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp. Lactis* batch fermentations. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p.571-578, 1992.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Bacteriocins of lactic acid bacteria – microbiology, genetics e applications. London, **Blackie Academic e Professional**, 1<sup>a</sup> edição, 539p, 1994.

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ MORENO, M. e REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **Brazilian Journal of Microbiology**. Amsterdam, v.2635, p. 1-20, 2003.

DEL CAMPO, R. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**. V. 45, p.905-912, 2001.

DIAS, R. S.; SILVA, S. L.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, M. B. C. M. **Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994**. In : Congresso Nacional de Laticínios, XII, 1995, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora : EPAMIG/ ILCT, p. 143 – 4, 1995.

DIONIZIO, F. L.; VALLE, R. H. P.; MARQUES, S. C.; MENDONÇA, A. T.; BOARI, C. A.; FREITAS, R. F. Presença de *Salmonella sp.* em queijo minas frescal e requeijão em barras produzidos artesanalmente na região de Salinas, norte de Minas Gerais, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2003, Belo Horizonte. *Anais*. São Paulo, 2003. P.57

DRIDER, D., FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DUPRE, I.; ZANETTI, S.; SCHITO, A. M.; FADDA, G. AND SECHI, L. A. Incidence of virulence determinants in clinical *E. faecalis* and *E. faecium* isolates collected in Sardinia. **Jounal Med. Microbiology**. v.52, p. 491-498, 2003.

DUPONT, H.; MONTRAVERS, P.; MOHLER, J.; CARBON, C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. **Infec. and Imm.**, v. 66, p. 2570-2575, 1998.

DU TOIT, M. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.88, p. 482-494, 2000.

DUTKA-Malen, S.; Evers, S.; Couvalin, P. **Detection of glycopeptide resistande genotypes and identificationh to the species level of clinically relevant enterococci by PCR**. J. of Clinical Microbiol., v. 33, p. 24-27, 1995.

EATON, T. J. & GASSON, M. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Enviroment Microbiology**. v.67, p.1628-1635, 2001.

EDITAL CT-AGRO/MDA/CNPQ 022/2004. Disponível em :<http://WWW.sigcti.mct.gov.br>. Acesso em 25 fever. 2007.

EIJSINK, V. G. H. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.81, p.639-654, 2002.

EIJSINK, V. G. H. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. **Jornal of Bacteriology**., Baltimore, v. 178, n. 8, p. 2232-2237, 1996

ELSNER, V. Virulence factors of *E. faecalis* and *E. faecium* blood culture isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 19, p.39-42, 2000.

ENDTZ, H. P.; VAN DEN, B. N., VERBRUGH, H. A., VAN BELKUM, A. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 18, p. 683-690, 1999.

ENNAHAR, S.; AOUDE – WERNER, D.; ASSOBEI, O.; HASSEIMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n.3, p. 521 – 526, 1998.

ENNAHAR, S.; DESCHAMPS, N. Anti-*listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM 01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 449-457, 2000.

ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de Ricotas comercializadas no Município de Campinas SP**. 2006, 97p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimento, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal “Peñamellena” cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, p. 737-746, 1999.

EUTHER, S. M.F.; TRIGUEIRO, I. N. S.; RIVEIRA, F. Condições higiênicas-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimatá Paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n. 2, Campinas, maio/jul, 1998.

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

FERREIRA, E. F. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. 2005, 126p. Dissertação ( Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “Queijo Coalho” produzido no Estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n. 59, p. 43 – 48,1999.

FONSECA, L. M.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. **Alguns parâmetros físico – químicos de queijo Minas produzido artesanalmente**. In : Congresso Nacional de Laticínios, XIII, Juiz de Fora, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Food & Applied Nutrition. **Foodborn pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**, The “ Band Bug Book”, 1998.

FOULQUIÉ, MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; De VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Massachusetts: **Kluwer Academic**, p.587 , 2000.

FRAIZER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food Microbiology**, 4 ed. New York: Graw – Hill, p. 494, 1988

FRANCE, B. D. G. M.; GUTH, B. E. C.; TRABULSI, L. R. Isolamento e características de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. **Microbiology**, v. 16, p. 49 – 55, 1985.

FRANCO, B. P. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**, São Paulo, Editora Atheneu, p. 182, 2002.

FRANK, J. P.; MARTH, E. H. Survey of and semisoff cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic. *Escherichia coli*. **Journal Food Protection**, Ames, v.41, n.3, p. 198 – 200, 1978.

FRANK, J. P.; MARTH, E. H.; OLSON, N. F. Survival of enteropathogenic and nonpathogenic. *Escherichia coli* during the manufacture of Cammember cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n. 12, p.835 – 842, 1977.

FRANZ, C.; SCHILLINGER, U. e HOLZAPFEL, W. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 FROM OLIVES. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.29, p.255-270, 1996.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety ? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCCHOLL-SILBERHORN, A.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4385-4389, 2001.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.4, p. 315 – 319, 1990.

FULANETTO, S. M. Dados sobre a presença em alimentos ou manipuladores de alimentos, de bactérias responsáveis por toxinfecções de origem alimentar,

no Brasil. **Anais da IV Semanário Latino – Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, São Paulo, p. 167 – 170, 1982.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 35, n.210, p. 33 – 36, 1980.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revevista Saúde Pública**. v.39, p.1-5, 2005.

FURRER, B.; Candrian, U.; Hoefelein, Ch.; Luethy, J. **Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments**. *J. Appl. Bact.*, 70: p. 372 – 379, 1991.

GILMORE, M. S.; SEGARRA, R. A.; BOOTH, M. C.; BOGIE, C. P.; HALL, L. R.; CLEWELL, D. B. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pADI-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7335-7344, 1994.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti – *Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 291 – 299, 1995.

GIRAFFA, G.; OLIVARI, A. M.; NEVIANI, E. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. **Food Microbiology**, v. 17, p. 671-677, 2000.

GIRAFFA, G. *Enterococci* from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2/3,p.215-222, 2003.

GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W. M. & KIM, H. V. 1972. *Bacillus cereus* : food poisoning organisms. **Review Journal Milk Food Technol**, 35: 213 – 227.

GOLDMANN, D. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* :**Headline News**. Infection control and Hospital Epidemiology. Boston, v.13, n. 12, p. 695-699, 1992.

GOMES, B.C.; ESTEVES; C.T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, 25: 668-675, 2008.

GORDTS, B. Vancomycin resistant *Enterococci* colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Brugge, v. 33, n.11, p. 2842-2846, 1995.

GRANVM, P. E. *Bacillus cereus* and toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 76, Symposium Supplement, 1994.

GRAPPIN. R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**. v. 7, p.547, 1997.

HANDWERGER, S. AND SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring highlevel vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v.39, p.2446-53, 1995.

HARTMAN, P.A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. IN: APHA (American Public Health Association). **Copendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4° ed. Washington: APHA, Chap 32, p. 523-529, 2001.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like

substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 99, n. 6, p. 77-84, 2005.

HERSHBERGER, E.; DONABEDIAN, S.; KONSTANTINO, K.; ZERVOS, M. J. Quinupristin-Dalfopristin resistance in Gram-positive bacteria: Mechanism of resistance and epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, p. 92-98, 2003.

HERRANZ, C. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages production the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 115-131, 2001.

HICKEY, R. TWOMEY, D.; ROSS, R. e HILL, C. Potencial of the enterocin regulatory system to control expression of heterologous genes in *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.95, p.390, 2003.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's of Manual Determinative Bacteriology**, 9<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Willia Ms & Wilkns, 2000, 787p.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocinas and food – grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, n. 3, p. 343 – 362, 1995.

HURTS, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. IN: Branen, A. L. Davidson, P. M. Ed. **Antimicrobial in Foods**. Marcel Deckker Inc., New York, USA, p. 327-351, 1983.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 517, de 14 junho de 2002. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 591, de 26 de maio de 2003. Inclui município na micro região do Serro.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 619, de 1º de dezembro de 2003. Identifica a microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo Minas artesanal.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Programa Selo Azul de Qualidade – Pro – Queijo Canastra. Belo Horizonte, IMA, 1999.

IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Portaria nº 694, de 17 de novembro de 2004. Identifica a micro região da Canastra.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOOD – ICMSF. Microorganisms in food: Characteristics of Microbial pathogens. London: **Blackie Academic & Professional**, v.5, p.513, 1998.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. IDF-FIL., N.º.88, P. 1-3, 1979.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. Brussels, n.º.20, p. 1-3, 1962.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas Analíticas do IAL. D.B. Rebocho Ed. São Paulo –SP, 1995.

IRETON, K.; COSSART, P. Host – pathogen interactions during entry and actinbased movement of *Listeria monocytogenes*. **Annual Reviews Genetic**, v. 31, 1997.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram – positive bacteria. **Microbiology Reviews.**, v. 59, p. 171 – 200, 1995.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimento**, trad. Eduardo César Tondo et al.; 6 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005; p.508 – 510.

JENNES, W.; DICKS, L. e VERWOERD, D. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.88, p.349-357, 2000.

JONES, M. E.; DRAGHI, D. C.; THORNSBERRY, C.; KARLOWSKY, J. A.; SAHM, D. F. and WENZEL, R. P. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – a European and North America surveillance study (2000-2002). **Annal of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 3:14, 2004. Disponível em <http://www.ann-clinmicrob.com/content/pdf/1476-0711-3-14.pdf>. Acesso em : 10 novembro 2007.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p.2803-2812, Sept. 2004.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin MN and characterization of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipids Vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(12):4529-4535, 1996.

KEMPERMAN, R.; KUIPERS, A.; KARSENS, H.; NAUTA, A.; KUIPERS, O.; KOK, J. Identification and characterization of two novel clostricidal bacterions, circularin A and clostricin 574. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1589-1597, 2003.

KLARE, I.; WERNER, G.; WITTE, W. Enterococci. Habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. **Contributions to Microbiology**, v. 8, p. 108-122, 2001.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Letters**, v. 12, n. 1/3, p. 39-86, 1993.

KLOOS, W. E. Systematics and natural history of *Staphylococci*. **Journal Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v.70, p. 225 -375, 1990.

KONACKI, J.L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>o</sup> ed. Washinton: APHA, 2001. Chap. 8, p 69-82.

KONEMAN. E. W. Diagnostico Microbiológico. Texto e atlas colorido. 5 ed. Rio de Janeiro. **Medsa**. P. 608-611, 2001.

KUHN, I. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to an ongoing project within de European research programme. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 337-342, 2000.

KÜHN, I. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.88, p. 133-145, 2003.

LAICINI, Z. M. Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijos recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. **Revista Instituto Adolfo Lutz**,v.53, p.17-20, 1993.

LEAVIS, H.; TOP, J.; SHANKAR, N.; BORGAN, K.; BONTEN, M.; EMBDEN, J. AND WILLEMS, R. J. L. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **Journal Bacteriol** . v. 186, p. 672-682, 2004.

LECLERCQ, R. Enterococci acquire new kinds of resistance. **Clinical and Infectious Diseases**., v.24, suppl. 1 , p. S80-S84, 1997.

LEMCKE, R.; BULTE, M. Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p.185-194, 2000.

LEROY, F. e DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase.

**International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.72, p. 155-164, 2002.

LIMA, E. C., MENDES, E. S., MENDES, P.P. et al. Pesquisa de coliformes e contagem total de germes em queijo de “coalho” comercializados no município de Recife/PE. In **CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, Anais, Juiz de Fora, p.180-183, 1996.

LOGUERCIO, A. P.; Aleixo, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n.6. Santa Maria, 2001.

LUDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science Supplement**, v. 87, p. E6-E11, 2004.

LYON, W. J.; OLSON, D. G.; MURANO, E. A. Isolation and purification of enterocin ELI, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.8, p. 890 – 898, 1995.

MACHADO, E.C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, M. S.; JUNIOR, F. N. P. Características físico – químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, Campinas, 2004.

MAGRO, M. L. M.; CORBACHO, J. M. M.; SORRIBES, C. H. et al. Las bacteriocinas de lãs bacterias lácticas 1 : Definicion, Classificacion, caracterizacion y métodos de detección. **Alimentaria**, v. 37, p. 59 – 74, 2000.

MAIETTI, L.; BONVINI, B.; HUYS, G.; GIRAFE, G. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from daairy products. **Sister and Applied Microbiology**, v.30, p. 509-517, 2007.

MAISNIER-PATIN, S.; FORNI, E.; RICHARD, J. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n. 3, p. 255 – 270, 1996.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRE, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.

McKAY, A. M. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria spp.* **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n.1, p.15 – 17, 1990.

Mc MULLEN, L. M., STILES, M. E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal Food Protection**, Ames, suppl., p. 64-71, 1996.

Minas Gerais. Decreto 42645, de 05 de junho de 2002 Aprova o regulamento da Lei n° 14185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo artesanal.

Minas Gerais. Lei 14185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos Aprovado pela Portaria n° 14/96, de 7 de março de 1996.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **International Dairy Bull**, n.377, p. 4 -9, 2003.

MONTVILLE, T. J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology Biotechnology.**, v. 50, p. 511-519, 1998.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilização no processamento de queijo minas frescal.** 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MORENO, M. R. F. *et al.* Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 73-84, 2003.

MORENO, I.; LERAYER, A. L.S.; LEITÃO, M. F. F. Bacteriocinas de Bactérias Láticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua Eficiência. **Revista de Laticínios**, São Paulo, v.2, n.13, p.45-48, 1998.

MORRISON, D.; WOODFORD N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 89-99, 1997a

MORRISON, D. PCR typing of *Enterococcus faecium*. **Advance in Experimental Medicine Biology**, New York, v. 418, p. 387-391, 1997b.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Suppl., v. 56, p. 54-63, 1996.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V.38, 1999.

NALLAPAREDDY, S. R.; WEINSTOCK, G. M. AND MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1733-1747, 2003.

NASCIMENTO, M. S. **Efeito inibitório de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus***, 2007. Tese ( Doutorado em Tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimento, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2007.

NCCLS. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – Eighth edition, NCCLS document M2-A\* (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

NETO, L. G. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. . **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, Belo Horizonte, set. 2005.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros , Minas Gerais, com ênfase em leveduras. Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento)- Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, 2007.

NILSEN, T.; NES, I. e HOLD, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* ctc492. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.180, p. 1848-1854, 1998.

Effects of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheeses. **International Dairy Journal**. v.7, p. 547-563, 1981.

NUÑEZ, M.; RODRÍGUEZ, J. L. CARCÍA, E.; GAYA, P.; MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **Jornal of Applied Microbiology**, v.83, n.6, p.671 – 677, 1997.

OLASUPO, N. A. *et al.* Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. **Food Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 157-167, 2001.

OLIVEIRA, C. A.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, p. 13 – 16, 1999.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food environmental samples. In: CANADA. Health Products Food Branch. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods**, (MFHPB) Ottawa, 2001.

PARENTE, E. e HILL, C. Characterization of Enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 497- 508, 1992.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, v.15, p.831-844, 2005.

PEREIRA, A. J. G. Fabricação de Queijos. Belo Horizonte: **CETEC**, 1980.  
7p.(apostila)

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Avaliação de ensaios analíticos para detecção de coliformes fecais em queijos Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, Belo Horizonte, 1999.

PEREIRA, M. L.; CAMARGO, L. S.; COLEN, G. *et al.*; Avaliação das condições higiênico-sanitárias de queijos comercializados no município de Belo Horizonte,

MG. 1987. In: **Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**, 3, Florianópolis, 1987. Anais. s.p., 1987.

PEREIRA, M. L.; CASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALENO, E. S. C. Enumeração de Coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v.51, n. 5. Belo Horizonte, 1999.

PEREIRA, K. C., Sá, O. R.; PEREIRA, K. C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo canastra e de sua matéria prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). **Ciencia ET Práxis**, v.1, n.2, 2008.

PEREIRA, K. C., RIGOLIN-SÁ, ODILA. Avaliação da qualidade higiênica – sanitária do queijo canastra, leite cru e água utilizados na sua produção na região de São Roque de Minas-MG. Passos/MG 2006. Projeto (Aprovação pela Fundação de Amparo a pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Departamento de microbiologia, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG).

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMAS, I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M.; Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e testes de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63 – 70, 2001.

PERESI, J. T. M., ALMEIDA, I. A. Z. C., TEIXEIRA, I. S. C.; LIMA, S. I.; CARNICEL, F. A.; HOFFMAN, F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003 na região de São Jose do Rio Preto. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 32-237, 2004.

PÉREZ-PULIDO, R. ABRIOUEL, H.; BEM OMAR, N.; LUCAS, R.; MARTINEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Safety and potencial risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 2070 2077, 2006.

PERRY, K. S. P. Queijos : Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova** , v. 27, n. 2, São Paulo, 2004.

PIMENTEL FILHO, N. J.; MARTINS, J. E. J.; CUNHA, L. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Mod  
Ulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio, no fermento endógeno utilizado na produção de queijo minas artesanal do alto Paranaíba. **Revista do Instituto de laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora. V. 6, p. 295-298, 2005.

PRADO, C. S.; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C.R.; MOREIRA, E. C.; COSTA, J. O.; Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v. 52, n.4, Belo Horizonte, 2000.

QUEIJO CANASTRA. **Revista faz Ciência** n° 26, jun a ago 2006. Disponível em :<http://revista.fapemig.br/matera.php>. Acesso em 6 de março 2008.

QIN, X.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, M.; MURRAY, B. E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection and Immunologic**, v. 68, p. 2579-2586, 2000.

RAY, B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative: an overview. In: RAY, B.; DAESCHEL, M. (Ed.). **Food Biopreservatives of Microbial Origin**. Boca Raton: CRC Press, 1992.

REIBNITZ, M. G. R.; TAVARES, L. B. B.; GARCÍA, J. A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulase y Dnase positivos em queso. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 30, n.1, p. 8 – 12, 1998.

RESENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI Jr, O. D.; VIDAL-MARTINS; AMARAL, L. A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica

das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Vol. 59, n. 6, Belo Horizonte, Dec. 2007.

RESOLUÇÃO RDC n° 12, de 02 janeiro 2001, publicada no Diário Oficial da União de 30 de janeiro de 2001, **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**: Ministério da Saúde, Brasil.

REVISTA MINAS FAZ CIÊNCIA. n° 26 de junho a agosto 2006. Disponível em <http://revista.fapemig.br/materia.php?id=386>. Acesso em: 22 de jan. 2009.

RICE, L. B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S. R.; HUANG, W. AND MURRAY, B. E. A potential virulence gene, *hyl<sub>efm</sub>* predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal of infectious Diseases**. v.187, p.508-512, 2003.

ROCHA, J. A. K., Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em industria processadora de queijo Minas frescal, 2004, 77p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimento) – Faculdade de Engenharia de Alimento, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2004.

RODRÍGUES, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v.10, n.1/2, p. 7 – 15, 2000.

RODRIGUES, F. T.; VIEIRA, M. D.; SANTOS, J. L. et al.; **Características do queijo tipo Minas frescal comercializado em Viçosa-MG**. In: Congresso Nacional de Laticínios, 8, Juiz de Fora, 1995. anais, p. 233-235, 1995.

RUKURE, G., BESTER, B. H. Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. **Food control**, Oxford, v. 12, n. 1 p. 31-36, Jan., 2001.

SABIA, C.; MANICARDI, G.; MESSI, P.; NIEDERHAUSERN, S.; BONDI, M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus*

*casseiflavus* IM 416 K1 isolated from Italian sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 1/2, p.163-170, 2002.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZ, M. L. R.; Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde Pública**, v. 22, n. 5, São Paulo. 1988.

SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease em queijo Minas Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 54, p. 13 – 17 1998.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; MARTINS, A. M. C. V. CORTEZ, A. L. Qualidade Microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, 2006.

SALMINEN,S.; VON WRIGHT, A. Lactic acid bactéria. New York : **Marcel Dekker**, 1993, 442p.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 1998.

SANTOS, E. C.; GENIGEORGES, C.; FRAUER, T. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing Brazilian, Minas cheese. **Journal of food protection**, v. 3, p.172 – 176, 1981.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza – Ceará. **B Ceppa**, Curitiba, v.13, n.1, p.31 – 36, 1995.

SÃO PAULO. **Centro de Vigilância Epidemiológica**. Dados de surtos de DTA notificados por DIR e municípios em 2002. Disponível em: <<http://>

[www.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/Surtos\\_DTA02.ppt](http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/Surtos_DTA02.ppt)>. Acesso em: 31 jun. 2007.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M.D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, n.1/2, p125- 136, 2002.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Mechanisms of microbial disease. 3th edition, **Ed. Lippincott, Williams & Wilkins**, 1999.

SCHLIEVER, P. M.; GAHR, P. J.; ASSIMACOPOLULOS, A. P.; DINGES, M. M.; STOEHR, J. A.; HARMALA, J. W.; HIRT, H.; DUNNY, G. M. Aggregation and binding substance enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunologic**, **66**, p. 218-223, 1998.

SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v.68, n.3, p. 636 – 648, 2005.

SCHOUTEN, M. A.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; MEIS, J. F. G.; VOSS, A. and The European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.19, p. 816-822, 2000.

SCHMITT, N.; BOWMER, E. J.; WILLOUGHBY, B. A. Food poisoning outbreak attributed to *Bacillus cereus*. **Canadian Journal of Public Health**, Ottawa, v. 67, n5, p. 418-422, Sept/oct, 1976.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B.; TENREIRO, R. Virulence factors in fodd, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 13-22, 2003.

SILVA, M.C.; CASTRO, D. G. Ocorrência de surtos de intoxicação alimentar causada por queijo tipo “Minas”. In. **Congresso Nacional de Laticínios**, XIII.; 1995, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora : EPAMIG/ ILCT, p.145 – 7, 1995.

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

SINGH, K. V.; QIN, X.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Generation testing of mutants of *E. faecalis* in mouse peritonitis model. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, p. 1416-1420, 1998.

SIQUEIRA, J. F. M.; COELHO, D. T.; CHAVES, J. B. P.; FURTADO, M. M. Efeito da variação do teor de gordura do leite no rendimento do queijo Minas padronizado. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v.41, p.21 – 26, 1986.

SOUZA, J. M.; SILVA, M. C. C.; MARTINS V. M. B. C. et al.; Avaliação da qualidade microbiológica de queijos comercializados em Belo Horizonte, MG, no período de 1984 a 1991. In: **Encontro Nacional de Alimentos**, 8, Porto Alegre, Anais, p.79, 1993.

STAM, C.N. **Prevalence and persistence of select foodborne pathogens in a mid-atlantic turkey processing facility**, 2005, 76p. Master of Science Thesis. Food Science Department, North Carolina State University, 2005.

TAGG, J. R.; MCGIVEN, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v. 21, n.5, p.943, 1971.

TAUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhock**, v. 76, p. 115-137, 1999.

TOMPKIN, R. B. Controlo f *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Dês Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, nov. 2002.

TORRES, N.; CHANDAN, R. C. Catin American white cheese. **A review Journal of Dairy Science**, v. 64, p.552-557, 1981.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA.  
**Bacteriological Analytical Online**. Disponível em. Acesso em: 15 jan. 2007.

VANCANNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; KNIJFFI, E.; TORRIANI, S.; BJORKROTH, K. J.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DELLAGLI, F., HOLZAPFEL, W. H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 1381-1391, 2002.

VARGAS, O. L.; PORTO, M. A.; BRITO, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: municípios do Serro e de São Roque de Minas. **Revista do Instituto Laticínios “Candido Tostes”**, v. 53, p.19 – 49, 1998.

VERHEUL, A. *et al.* Modifications of membrane phospholipid composition in nisinresistant *Listeria monocytogenes* Scott A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3451- 3457, 1997.

VILLANI, F.; SALZANO, G.; SORRENTINO, E.; PEPE, O.; MARINO, P.; COPPOLA, S. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226 active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n.4, p. 380 – 381, 1993.

VLAEMYNCK, G. *et al.* Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1/2, p. 211-225, 1994.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, 2002.

WILLEY, B. M. et al. Detection of vancomycin resistance in enterococcus species. **Jounal Clinical Microbiology**, New York, v. 30, n. 7, p. 1621-4, jun. 2003.

YANG, R.; RAY, B. Factors influencing production of bacteriocinas by acid lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 11, n.4, p. 281 – 291, 1994.

ZAMFIR, M.; VANCANNEYT. M.; MAKRAS, L.; VANINGELGEM, F.; LEFEBURE, K. P. B.; SWINGS, J.; VUYST, L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romaniam dairy products **Systematic and Applied. Microbiology**, 2005.

# APÊNDICE A

## A1- AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO SERRA DA CANASTRA

**Tabela A.1** - Avaliação microbiológica de amostras de queijo Serra da Canastra comercializadas em Araras/SP segundo os padrões da RDC 12/01 ANVISA

Data de Coleta (triplicata)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Coliformes termotolerantes</i> (NMP/mL)	<i>Estafilococos coagulase positiva</i> (UFC/g)	<sup>1</sup> <i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)
<b>30/06/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	9	<100	< 100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
<b>28/07/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	1,5 x 10 <sup>1</sup>	< 100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
<b>1/08/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	2,0x 10 <sup>2</sup>
B	Ausência 25g	Ausência 25g	11	<100	1,5x 10 <sup>2</sup>
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
<b>11/08/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	2,1 x 10 <sup>3</sup>	< 100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	28	3,5 x 10 <sup>2</sup>	1,9 x 10 <sup>2</sup>
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	1,3 x 10 <sup>3</sup>	< 100
<b>18/08/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	4,2x 10 <sup>2</sup>	< 100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	< 100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	1,9 x 10 <sup>2</sup>	< 100
<b>25/08/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	210	<100	<100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	150	<100	<100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	64	<100	<100
<b>08/09/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	9	<100	<100
<b>22/09/08</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
<b>29/09/09</b>					
A	Ausência 25g	Ausência 25g	7	<100	<100
B	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100
C	Ausência 25g	Ausência 25g	<3	<100	<100

<sup>1</sup> Não estabelecido na RDC 12/01

A, B e C referente a amostras diferentes na mesma data de coleta

## APÊNDICE B

### B1- TESTES PRESUNTIVO PARA CONFIRMAÇÃO DE GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

**Tabela B.1** - Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 1 a 31 das amostras de queijo Serra da Canastra.

Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
<b>30/06</b>									
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	+	+	+	+	-
4	+	+	+	-	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	+	+	+	+	-
7	+	+	+	-	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	+	+	-	+	+	+	+	-
12	+	+	+	-	+	+	+	+	-
13	+	+	+	-	+	+	+	+	-
14	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>28/07</b>									
	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
16	+	+	+	-	+	+	+	-	-
17	+	+	+	-	+	+	+	+	-
18	+	+	+	-	+	+	+	+	-
20	+	+	+	-	+	+	+	+	-
22	+	+	+	-	+	+	+	+	-
23	+	+	+	-	+	+	+	+	-
24	+	+	+	-	+	+	+	+	-
25	+	+	+	-	+	+	+	+	-
26	+	+	+	-	+	+	+	+	-
27	+	+	+	-	+	+	+	+	-
28	+	+	+	-	+	+	+	+	-
29	+	+	+	-	+	+	+	+	-
31	+	+	+	-	+	+	+	-	-

**Tabela B.2** - Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 36 a 63 das amostras de queijo Serra da Canastra

Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
<b>01/08</b>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
36	+	+	+	-	+	+	+	-	-
39	+	+	+	-	+	+	+	-	-
42	+	+	+	-	+	+	+	-	-
44	+	+	+	-	+	+	+	-	-
45	+	+	+	-	+	+	+	-	-
46	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<b>11/08</b>	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
48	+	+	+	-	+	+	+	-	-
49	+	+	+	-	+	+	+	-	-
60	+	+	+	-	+	+	+	-	-
61	+	+	+	-	+	+	+	-	-
63	+	+	+	-	+	+	+	-	-

**Tabela B.3** - Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 64 a 99 das amostras de queijo Serra da Canastra

Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
<b>18/08</b>									
64	+	+	+	-	+	+	+	+	-
65	+	+	+	-	+	+	+	+	-
66	+	+	+	-	+	+	+	+	-
67	+	+	+	-	+	+	+	+	-
68	+	+	+	-	+	+	+	+	-
69	+	+	+	-	+	+	+	+	-
70	+	+	+	-	+	+	+	+	-
71	+	+	+	-	+	+	+	+	-
72	+	+	+	-	+	+	+	+	-
73	+	+	+	-	+	+	+	+	-
74	+	+	+	-	+	+	+	+	-
75	+	+	+	-	+	+	+	-	-
76	+	+	+	-	+	+	+	+	-
77	+	+	+	-	+	+	+	+	-
78	+	+	+	-	+	+	+	+	-
79	+	+	+	-	+	+	+	-	-
80	+	+	+	-	+	+	+	+	-
81	+	+	+	-	+	+	+	+	-
82	+	+	+	-	+	+	+	+	-
83	+	+	+	-	+	+	+	+	-
84	+	+	+	-	+	+	+	+	-
85	+	+	+	-	+	+	+	+	-
86	+	+	+	-	+	+	+	+	-
87	+	+	+	-	+	+	+	+	-
88	+	+	+	-	+	+	+	+	-
89	+	+	+	-	+	+	+	+	-
90	+	+	+	-	+	+	+	+	-
91	+	+	+	-	+	+	+	+	-
92	+	+	+	-	+	+	+	+	-
93	+	+	+	-	+	+	+	+	-
95	+	+	+	-	+	+	+	+	-
96	+	+	+	-	+	+	+	+	-
97	+	+	+	-	+	+	+	+	-
98	+	+	+	-	+	+	+	-	-
99	+	+	+	-	+	+	+	+	-

**Tabela B.4** - Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 100 a 135 das amostras de queijo Serra da Canastra.

Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	PCR <i>E. faecium</i>	PCR <i>E. faecalis</i>
<b>25/08</b>									
100	+	+	+	-	+	+	+	+	-
101	+	+	+	-	+	+	+	+	-
103	+	+	+	-	+	+	+	+	-
104	+	+	+	-	+	+	+	+	-
105	+	+	+	-	+	+	+	+	-
106	+	+	+	-	+	+	+	+	-
107	+	+	+	-	+	+	+	+	-
108	+	+	+	-	+	+	+	+	-
109	+	+	+	-	+	+	+	+	-
110	+	+	+	-	+	+	+	+	-
111	+	+	+	-	+	+	+	+	-
112	+	+	+	-	+	+	+	+	-
113	+	+	+	-	+	+	+	+	-
114	+	+	+	-	+	+	+	+	-
115	+	+	+	-	+	+	+	+	-
116	+	+	+	-	+	+	+	+	-
117	+	+	+	-	+	+	+	-	-
118	+	+	+	-	+	+	+	+	-
119	+	+	+	-	+	+	+	+	-
120	+	+	+	-	+	+	+	+	-
121	+	+	+	-	+	+	+	+	-
122	+	+	+	-	+	+	+	+	-
123	+	+	+	-	+	+	+	+	-
124	+	+	+	-	+	+	+	-	-
125	+	+	+	-	+	+	+	+	-
126	+	+	+	-	+	+	+	+	-
127	+	+	+	-	+	+	+	-	-
128	+	+	+	-	+	+	+	+	-
129	+	+	+	-	+	+	+	+	-
130	+	+	+	-	+	+	+	+	-
131	+	+	+	-	+	+	+	+	-
132	+	+	+	-	+	+	+	+	-
133	+	+	+	-	+	+	+	+	-
134	+	+	+	-	+	+	+	+	-
135	+	+	+	-	+	+	+	+	-

**Tabela B.5** - Testes presuntivos para confirmação de gênero *Enterococcus* e identificação de *E. faecium* e *E. faecalis* através da PCR dos isolados de número 137 a 181 das amostras de queijo Serra da Canastra.

Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
<b>08/09</b>									
137	+	+	+	-	+	+	+	+	-
138	+	+	+	-	+	+	+	+	-
139	+	+	+	-	+	+	+	+	-
140	+	+	+	-	+	+	+	+	-
141	+	+	+	-	+	+	+	+	-
142	+	+	+	-	+	+	+	+	-
143	+	+	+	-	+	+	+	+	-
144	+	+	+	-	+	+	+	+	-
145	+	+	+	-	+	+	+	+	-
146	+	+	+	-	+	+	+	+	-
147	+	+	+	-	+	+	+	+	-
148	+	+	+	-	+	+	+	+	-
150	+	+	+	-	+	+	+	-	-
151	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>22/09</b>									
Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
152	+	+	+	-	+	+	+	+	-
153	+	+	+	-	+	+	+	+	-
154	+	+	+	-	+	+	+	-	-
155	+	+	+	-	+	+	+	-	-
156	+	+	+	-	+	+	+	+	-
157	+	+	+	-	+	+	+	+	-
158	+	+	+	-	+	+	+	+	-
159	+	+	+	-	+	+	+	+	-
161	+	+	+	-	+	+	+	+	-
162	+	+	+	-	+	+	+	+	-
163	+	+	+	-	+	+	+	+	-
164	+	+	+	-	+	+	+	+	-
165	+	+	+	-	+	+	+	+	-
166	+	+	+	-	+	+	+	+	-
167	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<b>29/09</b>									
Amostra	Esculina	6,5% NaCl	pH 9,6	Catalase	Gram +	BHI 45°C	BHI 10°C	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
168	+	+	+	-	+	+	+	+	-
169	+	+	+	-	+	+	+	+	-
170	+	+	+	-	+	+	+	+	-
171	+	+	+	-	+	+	+	+	-
172	+	+	+	-	+	+	+	+	-
173	+	+	+	-	+	+	+	+	-
174	+	+	+	-	+	+	+	+	-
175	+	+	+	-	+	+	+	-	-
176	+	+	+	-	+	+	+	-	-
178	+	+	+	-	+	+	+	+	-
179	+	+	+	-	+	+	+	+	-
180	+	+	+	-	+	+	+	+	-
181	+	+	+	-	+	+	+	+	-

## APÊNDICE C

### C1- RESULTADOS DAS ANÁLISES FENOTÍPICAS RELACIONADAS A FATORES DE VIRULÊNCIA

**Tabela C.1** - Resultados das análises fenotípicas de fatores de virulência dos isolados presuntivos de *Enterococcus* de número 1 a 121 do queijo Será da Canastra.

Numero do isolado	Teste Gelatinase	Teste Hemólise	Numero do isolado	Teste Gelatinase	Teste Hemólise
1	-	-	73	-	-
3	-	-	74	-	-
4	-	-	75	-	-
5	-	-	76	-	-
7	-	-	77	-	-
8	-	-	78	-	-
9	+	-	79	-	-
10	-	-	80	-	-
12	-	-	81	-	-
13	-	-	82	-	-
14	-	-	83	-	-
16	-	-	84	-	-
17	-	-	85	-	-
18	-	-	86	-	-
20	-	-	87	-	-
22	-	-	89	-	-
23	-	-	90	-	-
24	-	-	91	-	-
25	-	-	92	-	-
26	-	-	93	-	-
27	-	-	95	-	-

---

28	-	-	96	-	-
29	-	-	97	-	-
31	-	-	98	-	-
36	+	-	99	-	-
39	-	-	100	-	-
40	-	-	101	-	-
42	-	-	103	-	-
43	-	-	104	-	-
44	-	-	105	-	-
45	-	-	106	-	-
46	-	-	107	-	-
48	-	-	108	-	-
49	-	-	109	-	-
60	-	-	110	-	-
61	-	-	111	-	-
63	-	-	112	-	-
64	-	-	113	-	-
65	-	-	114	-	-
66	-	-	115	-	-
67	-	-	116	-	-
68	-	-	117	-	-
69	-	-	118	-	-
70	-	-	119	-	-
71	-	-	120	-	-
72	-	-	121	-	-

---

**Tabela C.2** - Resultados das análises fenotípicas de fatores de virulência dos isolados presuntivos de *Enterococcus* de número 122 a 181 do queijo Será da Canastra.

<b>Numero do isolado</b>	<b>Teste Gelatinase</b>	<b>Teste Hemólise</b>	<b>Numero do isolado</b>	<b>Teste Gelatinase</b>	<b>Teste Hemólise</b>
122	-	-	152	-	-
123	-	-	153	-	-
124	-	-	154	-	-
125	-	-	155	-	-
126	-	-	156	-	-
127	-	-	157	-	-
128	-	-	158	-	-
129	-	-	159	-	-
130	-	-	161	-	-
131	-	-	162	-	-
132	-	-	163	-	-
133	-	-	164	-	-
134	-	-	165	-	-
135	-	-	166	-	-
137	-	-	167	-	-
138	-	-	168	-	-
139	-	-	169	-	-
140	-	-	170	-	-
141	-	-	171	-	-
142	-	-	172	-	-
143	-	-	173	-	-
144	-	-	174	-	-
145	-	-	175	-	-
146	-	-	176	-	-
147	-	-	178	-	-
148	-	-	179	-	-
150	-	-	180	-	-
151	-	-	181	-	-

## APÊNDICE D

### D1- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE *Enterococcus faecium*

**Tabela D.1** - Espectro antimicrobiano de *Enterococcus faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *Listeria monocytogenes*

Numero do isolado	<i>L. monocytogenes</i> (halo de inibição <sup>1</sup> )				
	IOC 1359	E1 008	C1 012	C1 021	C1 026
3	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0
78	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0
87	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0
99	0	0	0	0	0
105	0	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0
114	0	0	0	0	0
118	0	0	0	0	0
122	0	0	0	0	0
125	0	0	0	0	0
129	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0
134	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0
137	0	0	0	0	0
139	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0

147	0	0	0	0	0
148	0	0	0	0	0
151	0	0	0	0	0
153	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	0
157	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0
164	0	0	0	0	0
165	0	0	0	0	0
167	0	0	0	0	0
168	0	0	0	0	0
169	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	0
172	0	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0
178	0	0	0	0	0
179	0	0	0	0	0
180	0	0	0	0	0

<sup>1</sup> Halo de inibição em milímetro de diâmetro

**Tabela D.2** - Espectro antimicrobiano de *E. faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *Bacillus cereus*

Numero do isolado	<i>B. cereus</i> ( halo de inibição <sup>1</sup> )			
	E1 049	R1 070	K1 B040	K1B 048
3	0	0	0	0
5	0	0	0	0
7	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	0	0	0	0
14	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
22	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
65	0	0	0	0
66	0	0	0	0
68	0	0	0	0
74	0	0	0	0
78	0	0	0	0
81	0	0	0	0
87	0	0	0	0
90	0	0	0	0

---

91	0	0	0	0
99	0	0	0	0
105	0	0	0	0
108	0	0	0	0
111	0	0	0	0
114	0	0	0	0
118	0	0	0	0
122	0	0	0	0
125	0	0	0	0
129	0	0	0	0
130	0	0	0	0
134	0	0	0	0
135	0	0	0	0
137	0	0	0	0
139	0	0	0	0
142	0	0	0	0
147	0	0	0	0
149	0	0	0	0
151	0	0	0	0
153	0	0	0	0
156	0	0	0	0
157	0	0	0	0
159	0	0	0	0
161	0	0	0	0
164	0	0	0	0
165	0	0	0	0
167	0	0	0	0
168	0	0	0	0
169	0	0	0	0
171	0	0	0	0
172	0	0	0	0
174	0	0	0	0
178	0	0	0	0
179	0	0	0	0
180	0	0	0	0

---

<sup>1</sup> Halo de inibição em milímetro de diâmetro

**Tabela D.3** - Espectro antimicrobiano *E. faecium* isolados do queijo Serra da Canastra frente a isolados de *Staphylococcus aureus*

Numero do isolado	<i>S. aureus</i> (halo de inibição <sup>1</sup> )			
	E1 082	E1 090	C1 003	C1 009
3	0	0	0	0
5	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0
12	0	0	0	0
14	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
22	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
65	0	0	0	0
66	0	0	0	0
68	0	0	0	0
74	0	0	0	0
78	0	0	0	0
81	0	0	0	0
87	0	0	0	0
90	0	0	0	0
91	0	0	0	0
99	0	0	0	0
105	0	0	0	0
108	0	0	0	0
111	0	0	0	0
114	0	0	0	0
118	0	0	0	0
122	0	0	0	0
125	0	0	0	0
129	0	0	0	0
130	0	0	0	0
134	0	0	0	0
135	0	0	0	0
137	0	0	0	0
139	0	0	0	0
142	0	0	0	0
147	0	0	0	0
148	0	0	0	0
151	0	0	0	0
153	0	0	0	0
156	0	0	0	0
157	0	0	0	0

---

159	0	0	0	0
161	0	0	0	0
164	0	0	0	0
165	0	0	0	0
167	0	0	0	0
168	0	0	0	0
169	0	0	0	0
171	0	0	0	0
172	0	0	0	0
174	0	0	0	0
178	0	0	0	0
179	0	0	0	0
180	0	0	0	0

---

<sup>1</sup> Halo de inibição em milímetro de diâmetro

