

Universidade Brasil  
Campus de São Paulo

LIBERTA LAMARTA FAVORITTO GARCIA NERES

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE  
*Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE QUEIJO  
ARTESANAL

*IN VITRO* MICROBIAL SENSITIVITY PROFILE OF STRAINS OF *Escherichia coli* AND  
*Klebsiella pneumoniae* ISOLATED OF ARTISTICAL CHEESE

São Paulo, SP

2018

LIBERTA LAMARTA FAVORITTO GARCIA NERES

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE  
*Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE QUEIJO  
ARTESANAL

Orientadora: Profª Drª Dora Inês Kozusny Andreani

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

São Paulo, SP

2018

## FICA CATALOGRÁFICA

N363p Neres ,Liberta Lamarta Favoritto Garcia

Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de cepas de escherichia coli e klebsiella pneumoniae isoladas de queijo artesanal. / Liberta Lamarta Favoritto Garcia Neres. –São Paulo, SP: Universidade Brasil, 2018.

62 f. gráfs. color.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Dora Inês Kozusny Andreani

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil.

1. Coliformes termotolerantes. 2. queijos coalho.  
3. antibiótico. 4. qualidade sanitária I. Título

CDD 574

### Termo de Autorização

#### Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL"

Autor(es):

Discente: Liberta Lamarta Favoritto Garcia Neres

Assinatura: Liberta Lamarta F. G. Neres

Orientadora: Dora Inés Kozusny-Andreani

Assinatura: Dora Inés Kozusny-Andreani

Data: 30/julho/2018

TERMO DE APROVAÇÃO

LIBERTA LAMARTA FAVORITTO GARCIA NERES

“PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE  
*Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Dora Inés Kozusny-Andreani (Presidente)

Prof(a). Dr(a) Juliana Heloisa Pinê Américo Pinheiro (Universidade Brasil)

Prof(a). Dr(a). Anisio Storti (UNIFEV)

Fernandópolis, 30 de julho de 2018.

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a). Dora Inés Kozusny-Andreani

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais, Carlos Garcia e Floricena Garcia, pela dedicação e o amor demonstrado todos esses anos e por não permitir que eu desistisse dos meus sonhos.

Ao prof. Julio Ibiapina, meu esposo e companheiro, pelo apoio e incentivo na construção dessa jornada chamada mestrado.

Aos meus filhos (Julia e Miguel), por compreender e entender que nesses dois anos, tive que dar mais atenção ao mestrado. Saiba que tudo isso só serviu para nos unir mais.

## **AGRADECIMENTOS**

Chegou a hora de agradecer a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos vocês o meu sincero OBRIGADA.

A Deus.

A Universidade Brasil, pela oportunidade de fazer esse mestrado.

A Faculdade Guarai pelo apoio. Agradeço também as estagiárias do Laboratório de Microbiologia: Drielly Lima e Thallya Alves pela colaboração e dedicação nesta pesquisa.

A orientadora, professora, amiga Dr<sup>a</sup>. Dora Inês Kozusny Andreani, pela sensatez, inteligência e o bom exemplo profissional. Obrigada por tudo!

Aos professores do Mestrado em Ciências Ambientais pela riqueza dos conhecimentos recebidos, e a funcionária Ecreziana pela atenção e eficiência.

Aos colegas do Mestrado, cuja solidariedade foi de extrema importância, faço o agradecimento através da amiga Marivânia Santiago, que esteve sempre presente.

Aos colegas de trabalho da Diretoria Regional de Ensino e da Faculdade Guarai.

E, por fim, não poderia deixar de mencionar o homem da minha vida. Meu esposo Julio Ibiapina. Biólogo, professor, inteligente, e, sem dúvida, o homem mais incrivelmente talentoso que conheci. Obrigada por compreender e entender que nesses dois anos, tive que dar mais atenção ao mestrado. Saiba que tudo isso só serviu para nos unir mais.

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE  
*Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE QUEIJO  
ARTESANAL

RESUMO

No presente estudo objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica de queijos frescos e sua viabilidade comercial. Para tanto, foram avaliadas 80 amostras de queijos de diferentes produtores para confirmação de coliformes totais e termotolerantes. A partir das culturas positivas foram empregadas para identificação por correlação a aparência colonial, coloração de Gram e provas bioquímicas. Além disso, avaliou-se a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos. Em 97,5% das amostras foi confirmada a presença de *Escherichia coli* e em 2,5% foi identificada a existência de *Klebsiella pneumoniae*. As cepas de *E. coli* (84,8%) evidenciaram alta sensibilidade aos antibióticos, enquanto que 100 % das cepas de *K. pneumoniae* foram multirresistentes. Pelos resultados obtidos concluiu-se que os queijos apresentaram baixa qualidade microbiológica, deficiência das condições higiênico sanitárias, representando um risco potencial que este produto pode significar para a saúde pública.

**Palavra-chave:** coliformes termotolerantes, queijos coalho, resistência, antibiótico, qualidade sanitária.

**IN VITRO MICROBIAL SENSITIVITY PROFILE OF STRAINS OF  
*Escherichia coli* AND *Klebsiella pneumoniae* ISOLATED OF ARTISTICAL  
CHEESE**

**ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of fresh cheeses and their commercial viability. For that, 80 samples of cheeses from different producers were evaluated for total and thermotolerant coliforms. From the positive cultures were used for identification by correlation the colonial appearance, Gram staining and biochemical tests. In addition, the *in vitro* antimicrobial susceptibility and multiple antimicrobial resistance index were evaluated. In 97.5% of the samples the presence of *Escherichia coli* was confirmed and in 2.5% of *Klebsiella pneumoniae* was identified. *E. coli* strains (84.8%) showed high sensitivity to antibiotics, whereas 100% of strains of *K. pneumoniae* were multiresistant. The results showed that cheeses presented low microbiological quality, deficiency of hygienic sanitary conditions, representing a potential risk that this product can mean for public health.

**Key words:** thermotolerant coliforms, curd cheeses, resistance, antibiotic, sanitary quality.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estado do Tocantins, com destaque para o Município de Guaraí.....	29
Figura 2 - Feira livre do município de Guaraí – TO, 2018 .....	29
Figura 3 (A, B): comercialização do queijo na feira livre. Fonte: Autora.....	30
Figura 4 - Amostra sendo pesada na balança dentro do fluxo laminar .....	31
Figura 5 - NMP/g ou mL de coliformes a 35°C e 45°C, e confirmação de <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Adaptado de Silva et al., (2010).....	32
Figura 6 - Método da presença e ausência em meio de cultura específico. A: Lauril Sulfato Triptose-LST, B: Verde Bile Brilhante-VB e C: Caldo <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Autora.....	33
Figura 7 - (A, B,C): Estriamento de amostras positivas em Caldo <i>E. coli</i> em meio Eosina Azul de Metileno e identificação de <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Autora.....	34
Figura 8 - : Armazenamento de cepas bacterianas em tubos criogênicos. Fonte: Autora.....	35
Figura 9 - Colônias típicas de <i>Escherichia coli</i> (A), apresentando coloração verde metálico em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (B), e associação de <i>E. coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (C), isoladas de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil). Fonte: Autora.....	39
Figura 10 - Frequência de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes (IRMA > 0,20), isoladas de queijo fresco artesanal comercializados no município de Guaraí -TO. Fonte: a autora. ....	41
Figura 11 - Frequência de <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistentes (IRMA > 0,20), isoladas de queijo fresco artesanal comercializados no município de Guaraí -TO. Fonte: a autora. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos resultados do NMP/g de coliformes totais isolados de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil) .....	377
Tabela 2 - Média de NMP/g de coliformes termotolerantes nos isolados de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil). .....	388
Tabela 3 - Perfil de resistência aos antibióticos de Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae isoladas de queijo fresco artesanal comercializadas no município de Guaraí -TO. ....	400

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BPH** - Boas Práticas de Higienização

**DTAs** - Doenças Transmitidas por Alimentos

**ESBL** -  $\beta$ -lactamases

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IN 57** - Instrução Normativa nº 57

**KPC** - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MS**- Ministério da Saúde

**M $\beta$ L** - metalo- $\beta$ -lactamases

**N<sub>2</sub>** – nitrogênio atmosférico

**NDM** - New Delhi metalo- $\beta$ - lactamases

**NMP/g** – Número Mais Provável por Grama

**OXA** – oxacilinas

**RDC** – Resolução de Diretoria Colegiada

**RIISPOA** - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

**SIM** – Sistema de Inspeção Municipal

**TSI** – Triple Sugar Iron

**LST** - Lauril Sulfato Triptose

**VB** - Verde Brilhante Bile

**EC** - Caldo *Echerichia coli*

**EMB** - Eosina Azul de Metileno

**API** - Analytical Profile Index

**CLSI** - Clinical Laboratory Standard Institute

**IRMA** - Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	144
1.1 Objetivos gerais.....	166
1.2 Objetivos específicos.....	166
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	177
2.1 Queijo: Histórico.....	177
2.2 QUALIDADE DO LEITE: SEUS DERIVADOS E LEGISLAÇÃO.....	188
2.3 Bactérias que contaminam os queijos artesanais .....	222
2.4 Coliformes totais e termotolerantes .....	233
2.5 Klebsiella pneumoniae .....	255
2.6 Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública.....	266
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	287
3.1 Tipo de estudo.....	287
3.2 Caracterização da área de Estudo.....	288
3.3 Obtenção das amostras .....	29
3.4 Preparo da Amostra.....	300
3.5 Análise Microbiológica .....	311
3.6 Confirmação Bioquímica.....	355
3.7 Antibiograma .....	355
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	377
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	433
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	444

## 1 INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais são produzidos em pequenas propriedades, e em alguns casos a fabricação dos mesmos é realizada sem a adequada higienização do local e sem a pasteurização da matéria prima. Devido a sua composição nutricional e a falta dos devidos cuidados higiênico-sanitários, o queijo fresco artesanal se constitui em um importante meio para a proliferação de microrganismos patogênicos (SABIKHI, BHONGLE & SATHISH, 2015).

Um das características que torna o queijo tipo frescal artesanal um alimento que pode oferecer riscos à saúde humana, é o fato de ele ser constituído a base de leite cru e não passar por um processo de maturação, como também o local de sua produção, na grande maioria, ser um estabelecimento onde as condições higiênico-sanitárias são insatisfatórias (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016). A circulação dos patógenos por meio dos alimentos é muito comum e pode representar um risco potencial à saúde do consumidor. Portanto, a fim de evitar isso, boas práticas de higiene são necessárias em toda a cadeia de produção (RASHEED et al., 2014; MOUSSÉ et al., 2016).

Por isto, há preocupação em torno dos alimentos sobre a possibilidade de os mesmos transmitirem a população microrganismos patogênicos tais como bactérias do grupo dos coliformes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium*, *Salmonella*, entre outros, provocando o surgimento de surtos de toxinfecções alimentares de gravidade, causando desde um simples mal-estar até a ocorrência de casos fatais (RODRIGUES & FERREIRA, 2016).

É necessário compreender a importância de promover adoção de boas práticas na cadeia de produção de derivados do leite, para desta forma obter produtos manufaturados de qualidade. No entanto, em algumas propriedades o processo de ordenha é realizado sem higienização, acondicionamento inadequado ou na demora da destinação do leite pode acelerar o aumento do número de microrganismos patogênicos capazes de causar a deterioração do produto inviabilizando para o consumo *in natura* ou provocando várias doenças aos consumidores (DANTAS et al., 2013; FONTANETTI et al., 2015).

Portanto, a população em geral deve ter ao seu alcance alimentos de qualidade, que atenda padrões estabelecidos e condições higiênicas que propiciem uma alimentação saudável para os consumidores e não um veículo de doenças transmitidas por alimentos contaminados, pondo em risco a saúde pública (SALOTTI et al., 2006).

Com a finalidade de se evitar a contaminação durante o processo de produção do queijo, deve-se observar o indicador para a presença de coliformes totais e termotolerantes nos

alimentos em quantidade elevada e dentre esses patógenos, observou – se um indicador específico de contaminação, sendo esta a *Escherichia coli* (GASPAROTTO, ROCHA & GRECELLÉ, 2008; DORES et al., 2013).

A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais estudadas, é representante do grupo dos coliformes termotolerantes. É caracterizada por ser gram-negativa, fermentadora de lactose com consequente produção de gás e tem como consequência, além da alteração das características organolépticas do alimento, o estufamento da embalagem (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012). *Escherichia coli* é a espécie anaeróbia facultativa mais prevalente no trato gastrointestinal de humanos e animais, geralmente um micróbio inofensivo, mas também é uma bactéria importante do ponto de vista médico, causando uma série de doenças significativas (RASHEED et al., 2014).

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista que causa uma variedade de doenças infecciosas em humanos, incluindo septicemia, abscessos hepáticos, diarreia e pneumonia. É um patógeno hospitalar bem conhecido e associado ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Além do ambiente clínico, *Klebsiella pneumoniae* é frequentemente encontrada em alimentos, incluindo vegetais crus, fórmulas infantis em pó, carne, peixe, laticínios, entre outros e, tem sido considerada como um importante patógeno de origem alimentar. Nos últimos anos, um número crescente de surtos de origem alimentar causados por *Klebsiella pneumoniae* foram relatados em diferentes países (YAO et al., 2015; DAVIS & PRICE, 2016; GUO et al., 2016; MILANOVIĆ et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

O surgimento de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos são de grande preocupação mundial na medicina humana (HU et al., 2013). Assim, a disseminação destas bactérias resistentes como resultado do consumo de alimentos contaminados, como carne mal cozida, frutos do mar crus, leite e produtos lácteos não pasteurizados, representa um risco a saúde pública (MILANOVIĆ et al., 2017). Além disso, essas bactérias podem transferir determinantes de resistência a antibióticos para outras bactérias patogênicas (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

Portanto, a vigilância e o monitoramento de bactérias resistentes a medicamentos em alimentos são importantes, na implantação de estratégias de controle direcionadas para selecionar antibióticos eficazes para o tratamento de doenças infecciosas (ZHANG et al., 2018). Os patógenos resistentes mais comumente isolados da cadeia alimentar são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, consequência do uso extensivo de antibióticos na pecuária com a finalidade de aumentar a produção animal e, da utilização indiscriminada na

terapéutica, o qual representa pressão seletiva de genes de resistência nas bactérias (GUO et al., 2016; ARENAS & MELO, 2018).

Considerando os aspectos descritos e, as características de produção e de comercialização do queijo frescal artesanal, no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil), é importante avaliar a qualidade microbiológica de queijos frescos e sua viabilidade comercial.

## **1.1 Objetivos gerais**

Avaliação do perfil de sensibilidade aos antibióticos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas dos queijos artesanais comercializados no município de Guaraí - TO.

## **1.2 Objetivos específicos**

- Determinar e quantificar pela técnica de tubos múltiplos o número de coliformes totais e termotolerantes nas amostras;
- Verificar a presença de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*;
- Analisar o perfil de resistência múltipla às drogas antimicrobianas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Queijo: Histórico

Não se sabe ao certo sobre o início da produção de queijos no mundo. No entanto, é uma das maiores e úteis conquistas do homem, pois, durante muitos séculos, o queijo foi a única forma de conservação dos principais constituintes do leite (ZACARCHENGO et al., 2013).

Entretanto, a história revela que os egípcios foram os primeiros povos a criar gado e que no leite e no queijo, perceberam uma fonte importante de alimentação e nas proteínas como um rico potencial biológico, além de outros importantes elementos inorgânicos como cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos (FREITAS FILHO et al., 2009; REIS et al, 2013). O fato é que o leite e seus derivados são grupos de alimentos antigos da civilização (FOX et al., 2000; ABIQ, 2014).

Por outro lado, há indícios que o queijo foi obtido pela primeira vez acidentalmente, pois o leite era transportado em recipientes feitos com estômagos de animais, cujas enzimas causavam a sua coagulação, devido a fermentação da lactose, formando dois subprodutos (Soro e o Queijo). O agente que promove a coagulação do leite para produção de queijos é conhecido como coalho de bezerro, pode ser extraído do quarto estômago de bezerros em lactação (SEBRAE, 2008; ALBUQUERQUE, 2009; VISOTTO et al., 2011).

Estas enzimas conhecidas como coalho, constituídas pelas enzimas quimosina e pepsina, que até hoje é um importante ingrediente na fabricação do queijo (CHALITA, et al. 2009). No entanto, a presença destas enzimas coagulantes, podem apresentar composições enzimáticas diferenciadas, podendo ser de origem animal, vegetal e/ou de microrganismos e variar tanto em quantidade de enzimas, quanto em qualidade referente ao tipo de enzima (NEELAKANTAN et al., 1999; SEBRAE, 2008).

Porém, com a chegada dos colonizadores portugueses no Brasil, a primeira providência foi investir em gado, devido ao leite ser um derivado útil para a produção do queijo tipicamente artesanal (SILVA, 2010) no século XVIII em terras mineiras, os exploradores começaram a produzir queijo artesanal, desenvolvendo, sobretudo, o chamado queijo frescal de Minas (REBELO, 1983; DIAS, 2010).

Por tanto, o queijo é definido como um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácticos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação

de substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

## **2.2 QUALIDADE DO LEITE: SEUS DERIVADOS E LEGISLAÇÃO**

### **2.2.1 Alimentos derivados do leite**

O leite se apresenta como um alimento de origem biológica, um produto da secreção mamária de mamíferos, apresenta sabor leve, agradável e ligeiramente adocicado (BRASIL, 2002; SILVA et al., 2007; TRONCO, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Por isso, é um excelente alimento, constituído de água, gordura, proteínas, vitaminas, carboidratos, sais minerais (NASCIMENTO et al., 2001; GRACINDO & PEREIRA, 2009; SOUZA et al., 2009) e cálcio como elementos essenciais para a formação e manutenção dos ossos e um suplemento alimentar para todas as faixas etárias (FERREIRA et al., 2013). Assim como carnes e ovos, representam a maior parte da parcela proteica de origem animal consumida pela população.

Entre os derivados do leite, o queijo que se destaca por ser um dos mais consumidos e ao mesmo tempo considerado como um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os produzidos artesanalmente, por serem na maioria das vezes, elaboradas a partir de leite cru e não sofrerem processos de maturação (FEITOSA et al., 2003; MELO; ALVES; COSTA, 2009).

Para que esses produtos sejam de boa qualidade e as contaminações não sejam tão comuns é necessário que a matéria prima, o leite, apresente características físico químicas e biológicas satisfatórias (VISOTTO et al., 2011; OLIVEIRA, 2016).

No entanto, Zoccal, Alves e Gasques (2011) salienta que a má qualidade do leite cru e as condições sanitárias dos estabelecimentos são dois problemas difíceis de serem resolvidos e essa situação se deve a existência de muitos estabelecimentos que desenvolvem atividade leiteira em condições precárias. No Brasil, a qualidade dos queijos frescos pode estar comprometida por não atender as normas da legislação, comprometendo a segurança alimentar (FERREIRA et al., 2013; CASTRO et al., 2014).

O controle da qualidade é de suma importância para atividade leiteira, pois envolve desde uma boa estrutura em laboratórios, equipamentos de processos e veículos de transporte a treinamentos da mão de obra empregada. Nos procedimentos de produção do queijo, estes fatores são de extrema importância, principalmente quando na fabricação é empregado leite

cru, há ausência de técnicas de Boas Práticas de Higienização e produção, ou não existe observância do tempo mínimo de maturação (PINTO et al., 2009; MARTINS et al., 2013; TEODORO et al., 2013).

### 2.2.2 Queijo artesanal

Em relação aos produtos derivados do leite de maior consumo no Brasil, os queijos produzidos de forma artesanal se destacam pelo preço e pela facilidade de produção, pois são fabricados a partir de leite cru (FEITOSA et al., 2003; APOLINÁRIO, SANTOS & LAVORADTO, 2014). Os laticínios constituem um grupo de alimentos de grande valor nutricional e rico em proteínas, além de conterem vitaminas e sais minerais. O leite e seus derivados merecem uma atenção especial, pois o consumo desses alimentos é essencial para manutenção do organismo (MUNIZ, MADRUGA & ARAÚJO, 2013).

A qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, está certificada na Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), editada em 2 de janeiro de 2001, que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos. Essa resolução institui tolerância máxima e padrões mínimos para os diferentes grupos de produtos alimentícios, com a finalidade de registro e fiscalização. Para queijos de muita alta umidade (>55%), dentre eles, incluindo os queijos de coalhos e os Minas Frescal, delimita uma tolerância de  $5,0 \times 10^2$  NMP/g para coliformes termotolerantes,  $5,0 \times 10^2$  NMP/g para estafilococos coagulase-positiva e ausência de *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* em 25 g do produto (BRASIL, 2001).

O queijo de coalho que é reconhecido como um produto artesanal, uma vez que, segundo o Dicionário Larousse da Língua Portuguesa, é aquilo que “é elaborado segundo os métodos tradicionais, individuais”, e “o que é feito através de meios rudimentares, às vezes sem qualquer método; que apresenta feitura grosseira” (ANDRADE, 2012).

Este queijo detém segundo Brasil (2001) as seguintes características: massa branda ou mole e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras, possui coloração branco amarelado uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, lembrando massa de queijo coagulado. Possui ainda de médio a muito alta umidade (SEBRAE, 2008).

Portanto, o queijo artesanal é um produto tradicional e produzido por pequenos produtores, gerando renda para centenas de agricultores (DORES; FERREIRA, 2012), está atrelado a identidade sociocultural e gastronômica de uma população (CHALITA, 2012).

E para Menezes (2011) a produção de queijo artesanal é importante para agricultura familiar. Mas, ainda continua inserida no mercado informal por não cumprir a legislação vigente elaborado em meio a industrialização brasileira, sendo a produção de queijos artesanais comercializados direto ao consumidor em feiras livres.

### **2.2.3 Legislação**

No que tange à legislação ao tema, é necessário observar que todo o procedimento de comercialização do queijo necessita de uma licença para a operação o empreendimento. Desse modo, na legislação concernente ao objeto de estudo há e se expressar a legislação pioneira no assunto que foi o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, de 29 de março de 1952 (BRASIL, 1952).

Este decreto 30.691/52 estabelece as normas que regulam, em todo o território nacional, a inspeção e a fiscalização industrial e sanitária de produtos de origem animal, destinadas a preservar a inocuidade, a identidade, a qualidade e a integridade dos produtos e a saúde e os interesses do consumidor, executadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nos estabelecimentos registrados ou relacionados no Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 1952).

Sabendo que o queijo artesanal é um alimento com elevado grau de manipulação, além de ser elaborado a partir de leite cru, atos normativos específicos que regulamentam sua produção e comercialização foram criados a partir de 2002 conforme a Portaria n° 146, de 07 de março de 1996, que “aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Neste documento, a pasteurização do leite está prevista como uma etapa obrigatória: “O leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente [...]” (BRASIL, 1996a, p. 4).

Em seguida, com o escopo de regulamentar a importância da qualidade dos queijos, objetivando melhorar a casta, foi editada, pelo Ministério da agricultura, a instrução normativa 51 de 2002 que trouxe à baila Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado

e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com a Instrução Normativa (BRASIL, 2002).

O aspecto jurídico merece ainda destaque, pois essa instrução normativa fixa-se os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção, a identidade e a qualidade do leite tipo A, destinado ao comércio nacional. Entretanto, para que possa atingir a eficácia normativa, necessário se faz conceituar e diferenciar leite, de maneira genérica, e leite pasteurizado tipo A (BRASIL, 2002).

Preleciona a instrução normativa 51/02:

2.1.1. Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda;

2.1.2. Entende-se por Leite Pasteurizado tipo A o leite classificado quanto ao teor de gordura em integral, padronizado, semidesnatado ou desnatado, produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado “Granja Leiteira”, observadas as prescrições contidas no presente.

A lei deixa cristalino o entendimento sobre o que vem a ser leite e o que o peculiariza como pasteurizado.

Após a criação das leis e normas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, publicou em 16 de dezembro de 2011, a Instrução Normativa nº 57 (IN 57), a fim de esclarecer questões pertinentes à produção do queijo elaborado a partir de leite cru. A IN 57 permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias (BRASIL, 2011). O texto declara que (BRASIL, 2011):

- a maturação num período inferior a 60 dias será permitida após estudos técnicos científicos comprovarem que a redução não compromete a qualidade e a inocuidade do produto;
- a definição de um novo período de maturação será realizada por um ato normativo específico, após a avaliação dos estudos por um comitê técnico científico designado pelo MAPA;
- as propriedades rurais devem: 1) ser certificadas como livres de brucelose e tuberculose; 2) possuir um Programa de Controle de Mastite e realizar análises mensais do leite em laboratório da Rede Brasileira da Qualidade do Leite; 3) possuir um Programa de Boas Práticas de Ordenha e Fabricação e 4) realizar a cloração e controle da potabilidade da água

Adentrando-se ao Estado de Tocantins, onde o estudo se objetiva há a regulamentação da produção de queijos embasada no decreto nº. 5.751, de 7 de dezembro de 2017. Este dispõe sobre o regulamento da Lei Estadual 502, de 28 de dezembro de 1992, que disciplina a

fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal no Estado do Tocantins (TOCANTINS, 2017).

Inserido nesta normativa há o regramento dos estabelecimentos de leite e derivados; do registro e da transferência de estabelecimento; das obrigações dos estabelecimentos; da inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal; da reinspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal; do processo, das infrações e das sanções.

Nesse liame, o Município de Guaraí no Estado de Tocantins, no uso de suas atribuições, editou a lei orgânica 221 de 06 de novembro de 2009 que reza sobre a criação de inspeção municipal (SIM) para os produtos de origem animal e vegetal. Na verdade, a lei municipal é uma reiteração do decreto no 5.751 do Estado de Tocantins, prelecionando inicialmente sobre a criação do serviço de inspeção Municipal, depois regulamentando as regras de sanções e, por fim, dispondo do recolhimento de taxas (GUARAÍ, 2009).

Com isso através dessas normativas atinentes ao queijo é possível exercer o poder de polícia administrativa e fiscalizar a produção de comércio desta especiaria, de forma a impor limitações no interesse individualizado, em prol do interesse público sobre o privado (BRASIL, 1952).

### **2.3 Bactérias que contaminam os queijos artesanais**

O nível de contaminação e a composição da população bacteriana dependem da sanidade do rebanho, dos utensílios, dos equipamentos utilizados na ordenha e do processamento assim como das condições de armazenamento do leite e do tanque de refrigeração. Pois se o leite cru contém apenas uma pequena quantidade de bactérias, certamente é proveniente de uma fazenda com boas condições de higiene. Mas, caso ocorra uma presença significativa de bactérias o padrão de qualidade não é satisfatório e não atende a legislação (SILVA, 2010; BRITO et al., 2011).

Neste sentido, vários casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) irão surgir por meio do consumo da população em relação a produtos de origem animal, como exemplo o leite cru e derivados (DWIVEDI & JAYKUS, 2011; SAFE FOOD, 2014) e são transmitidas pela ingestão ou consumo de alimentos contaminado por bactérias (CRUZ, 2012).

Segundo Silva Junior (2014), existem aproximadamente 250 tipos de DTAs descritas na literatura e, dentre elas, uma parte significativa é causada por microrganismos patogênicos, pelo qual são responsáveis por graves problemas de saúde pública e causando riscos para

população (LITTLE et al., 2012). E por ser um produto bastante consumido pela população, o queijo torna-se um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em particular os artesanais (SILVA et al., 2013).

As bactérias são agentes etiológicos que estabelecem relação com as DTAs. Estudos realizados no Brasil apontam a detecção de diferentes bactérias potencialmente patogênicas em queijo fresco, com um destaque para *Escherichia coli* como contaminante destes produtos. (WINK, 2012). Assim, o queijo produzido artesanalmente com leite cru tem sido apontado por diversos trabalhos como vinculadores de microrganismos que contaminam o leite e de origem bacteriana, por isso são consideradas agentes etiológicos relacionados com a ocorrência de DTAs (WINK, 2012; DORES et al., 2013).

Na produção de queijos a presença de microrganismo patogênicos é preocupante e merece atenção. Pois dentre estes patogênicos, a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas spp*, *Klebsiella ssp* e *E. coli* são bactérias causadoras de intoxicações alimentares (BRITO et al., 2011).

Por isso, é fundamental adoção de políticas públicas como ferramenta de conscientização para melhorar a qualidade da matéria prima e a técnica de processamento para que o queijo artesanal se classifique no mercado como um produto de boa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário quanto da falta de padronização e de boas práticas de ordenha durante a obtenção do leite (SILVA et al., 2011).

Neste sentido, a produção do queijo artesanalmente tem sido discutido em diversos trabalhos na literatura brasileira (BADINI et al., 1996; BARBOSA, JATOBA & BATISTA, 2009) e uma variedade de trabalhos científicos relatam que os microrganismos como as bactérias do grupo coliformes totais e os termotolerantes, são os bioindicadores mais utilizados para a verificação das condições de higiene dos alimentos (GASPAROTTO, ROCHA & GRECELLÉ, 2008) e o indicador específico de contaminação é a *Escherichia coli* como uma bactéria patogênica frequentemente detectada como contaminante de queijos (SILVA et al., 2011; MENESES et al., 2012; MELO et al., 2013).

#### **2.4 Coliformes totais e termotolerantes**

A presença de coliformes em queijos torna-se cada vez mais preocupante em relação ao surgimento de surtos de infecções alimentares. Os coliformes são microrganismos que podem contaminar diferentes tipos de queijos. Estas bactérias se caracterizam por apresentar forma de

bacilos, Gram negativo, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos e pertencente à família Enterobacteriaceae, capazes de fermentar a lactose com produção de gás a 37°C em 24-48 horas, quando coliformes totais (OLIVER et al., 2008; LISITA et al., 2009; CHAURET, 2011; VAN ELSAS et al., 2011), e a 45°C quando coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais (BRASIL, 2011; OLANIRAN et al., 2011; TORTORA, FUNK & CASE, 2012; MARTINS & REIS, 2012).

O grupo de Coliformes totais é constituído por microrganismos do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (GRECHI, 2005; BETTEGA, 2006) e responsáveis por causar doenças (TORTORA, FUNK & CASE, 2012), e são encontradas no ambiente (solo, vegetação e água) e no trato gastrointestinal de animais, inclusive no homem e estão amplamente difundidos e podem ser detectados em diferentes alimentos (MADIGAN et al., 2010).

Os coliformes termotolerantes possuem características dos coliformes totais e abrange as bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais homeotermos, além de representantes não fecais que podem ser eliminados pela pasteurização. Sendo assim, a presença de coliformes termotolerantes em alimentos é considerado um indicador de contaminação, evidenciadas pela falta de práticas de higienização e sanitização aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos de qualidade (VON SPERLING, 2011) e sua população é constituída por *Escherichia coli*, que constitui uma grande proporção da população bacteriana intestinal humana (MADIGAN et al., 2010).

Entretanto, as espécies bacterianas que pertencem ao grupo dos coliformes são consideradas como agentes contaminantes e estão associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos (MORIEL et al., 2012). A *Escherichia coli* é o principal representante do grupo que pertence ao coliformes termotolerantes e ao grande grupo dos coliformes totais (VON SPERLING, 2011; GORDON, 2013; OMS 2014).

#### **2.4.1 *Escherichia coli***

No ano de 1885 o alemão Theodor Escherich isolou pela primeira vez a bactéria *Escherichia coli* no cólon do intestino humano, o que explica o termo “coli” e por muito tempo foi classificada como *Bacterium coli*. No entanto, após uma revisão a *B. coli* passou a ser chamada de *E. coli*

(KONEMAN, ALLEN & JANDA, 2008; MAINIL, 2013), recebendo o primeiro nome do seu descobridor.

As bactérias do gênero *Escherichia* são compostas por várias espécies patogênicas e não patogênicas (TORTORA et al., 2012), que cresce em meio complexo a 44° - 45°C em 24 - 48 horas fermentando a lactose e manitol com a produção de ácido e gás, produzindo indol a partir do aminoácido triptofano (BRITO et al., 2011; FENG, WEAGANT & JINNEMAN, 2011; ALLGAYER, SCHIRMER & CASTELAN, 2015).

Algumas linhagens de *E. coli* tem a capacidade de causar diarreias em crianças, colites hemorrágicas, disenterias, infecções de bexiga e dos rins, septicemia, pneumonia e meningite (POLLINI et al., 2012, BAPTISTA, 2013).

A *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais abundantes no trato gastrointestinal (MOURA et al., 2012). Esta bactéria é um dos principais agentes envolvidos em doenças infecciosas, sendo responsável por cerca de 50% dos casos de sépsis e de mais de 70% de infecções do trato urinário, e de uma percentagem significativa de infecções intestinais (ALLGAYER et al., 2015).

As linhagens de *Escherichia coli* associadas a doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são disseminadas como consequências das práticas inadequadas de higienização, por via fecal-oral e pelas mãos contaminadas por manipuladores de alimentos suscetíveis à infecção como carnes, hortaliças, leite e água não tratada. Além disso, com menor intensidade, pode ocorrer transmissão de pessoa para pessoa, principalmente em locais onde existe pouca higienização (FERENS & HOVDE, 2011; VAN ELSAS et al., 2011; FORSYTHE, 2013). Segundo Clark (2010), algumas linhagens desta espécie bacteriana são potencialmente resistentes a múltiplos fármacos, devido a seu amplo contato com agentes químicos.

Hauser (2010) também descreve a *Escherichia coli* como responsáveis por infecções intra-abdominais, gastroenterite e pneumonias adquiridas em hospitais e Clark (2010) cita essa bactéria como potencialmente resistentes a múltiplos fármacos, isso devido a seu amplo contato com agentes químicos.

## **2.5 *Klebsiella pneumoniae***

A bactéria do gênero *Klebsiella* foi designado por Trevisan em 1885, em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *K. pneumoniae* (HAUSER, 2010; ALENCAR, 2017). A

espécie *Klebsiella pneumoniae* é encontrada na água, solo, plantas e esgoto. E são representadas por cinco espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* e *K. ornithinolytica* (MOREIRA, et. al., 2009; CHAKROBORTY et al., 2017).

A espécie *K. pneumoniae* uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa e oportunista, oxidase negativa, fermenta glicose, reduz nitrato, indol negativo, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, utiliza o citrato como fonte de carbono e também hidrolisa a uréia (HAUSER, 2010), pertence à família Enterobacteriaceae, sendo uma espécie importante do gênero (VUOTTO et al., 2014).

Essa espécie diferencia-se das outras enterobactérias pois é a única deste grupo com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) no ambiente (HLOPE & MCKERROW, 2014). Esse microrganismo também pode descarboxilar alguns aminoácidos para formar aminas (CLARK, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* é um importante agente de infecções oportunistas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (GARBATI & AL GODHAIR, 2013; MOAYEDNIA et al., 2014; TSAI et al., 2014), destacando-se pela resistência a diversos antimicrobianos, tornando o tratamento difícil e com altos índices de morbidade e mortalidade (GARBATI & AL GODHAIR, 2013; TSAI et al., 2014).

## **2.6 Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública**

No atual cenário de adoção de políticas públicas, surgiu um sinal de alerta em relação a uma variedade de patógenos com características multirresistentes e causadores de infecções relativas à saúde. Dentre esses patógenos encontram-se: *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp*, *E. coli*, *Klebsiella spp*, sendo algumas que linhagens são produtoras das enzimas beta lactamase e carbapenemase (MOAYEDNIA et al., 2014).

O termo multirresistente é designado para definir os organismos resistentes a um número expressivo de antimicrobianos. (DIENSTMANN et al., 2010). Entre as espécies da família Enterobacteriaceae, linhagens de *K. pneumoniae* multirresistentes é cada vez mais frequente (KALLEN et al., 2010; ANDRADE et al., 2011). No entanto, é necessária uma atenção especial em relação ao uso humano de antibióticos, mesmo sabendo que constituem uma das mais relevantes descobertas médicas que colaboram para a redução da morbidade e mortalidade. A utilização intensiva e indevida de tais medicamentos resulta no surgimento de

resistência em vários patógenos, reduzindo as possibilidades terapêuticas no combate a infecção (BLAIR et al., 2015; OMOREGIE et al., 2010).

O aumento da multirresistência em cepas bacterianas tornou-se um problema para os sistemas de saúde, representando uma ameaça para comunidade. As infecções causadas por estas bactérias provocam 25% das mortes no mundo e 45% nos países menos desenvolvidos (DEL PELOSO, BARROS & SANTOS, 2010; NICOLINI et al., 2013). Por isso, requer uma atenção especial e imediata no controle da disseminação dessas cepas resistentes (KOUSTA et al., 2010; MUNIR & XAGORARAKI, 2011; DIAS et al., 2012).

A espécie *Klebsiella pneumoniae* expressa resistência a 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico (GIAKKOUPIS et al., 2010; CORREA et al., 2013) e, é tida como um problema de saúde pública, sendo notória a preocupação em relação as mortes causadas pela bactéria (CHEN et al., 2012).

Um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos é a produção de enzimas dos tipos *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), oxacilinases (OXA), metalo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ L), dentre estas, um destaque para a New Delhi metalo- $\beta$ - lactamases (NDM), ou a associação entre outras  $\beta$ -lactamases (ESBL ou AmpC) e redução da permeabilidade aos antimicrobianos (HUDSON et al., 2014). Desta forma, *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes representa um problema e um grande desafio para comunidade científica, pois confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (DIENSTMANN et al., 2010).

O tratamento de bactérias de enzimas inibidoras de antimicrobianos é extremamente difícil. Porém, estratégias de prevenção de atuação conjunta são desenvolvidas globalmente para o enfrentamento do problema (OMS, 2014). No entanto, a falta de conhecimento da população sobre os riscos à saúde humana da resistência bacteriana agrava a situação (PEIRANO et al., 2008; DEL PELOSO, BARROS & SANTOS, 2010).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Tipo de estudo**

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, caracterizado pelo emprego de quantificação nas modalidades de coleta de informação e no tratamento por meio de técnicas estatísticas utilizando o programa R, como percentual, média, desvio-padrão, mínimo e máximo, possibilitando, conseqüentemente, uma margem de segurança quanto às conclusões (RICHARDSON, 2010; MARCONI & LAKATOS, 2011).

### **3.2 Caracterização da área de Estudo**

O presente estudo trata-se de uma proposta de trabalho metodológico prático, que foi desenvolvido no município de Guaraí (Figura 1) com extensão territorial de 2.268 km<sup>2</sup> e está situado na Mesorregião Ocidental do Tocantins e Microrregião de Miracema do Tocantins, sede da 6ª Região Administrativa do Estado, distante 173 km da capital do Estado (Palmas). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE (2016), possui uma população de 25.399 habitantes de acordo com o censo demográfico de 2016, com coordenadas aproximadas 08°50'03" S e 48°30'37" W. O clima da região segundo a classificação é do tipo Aw com clima tropical e inverno seco (KOPPER, 1948). O município é considerado como um importante centro comercial. Além disso, sua economia baseia-se na agricultura e pecuária.

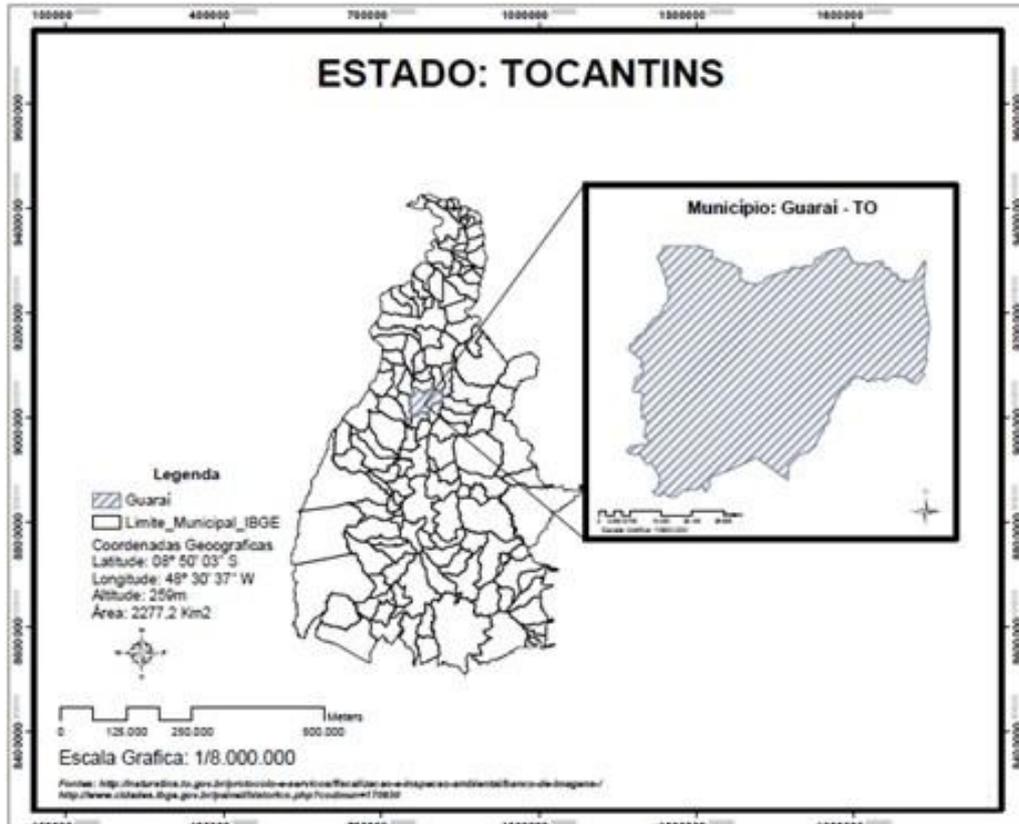


Figura 1 - \_Estado do Tocantins, com destaque para o Município de Guaraí.

### 3.3 Obtenção das amostras

Foram adquiridas 80 amostras de queijos artesanais, provenientes de oito produtores, e comercializados na feira livre no município de Guaraí (Figura 2). As amostras foram adquiridas no período de junho de 2017 a abril de 2018, colhidas aleatoriamente em diferentes pontos, correspondendo a dez repetições por produtor.



Figura 2 - Feira livre do município de Guaraí – TO, 2018

As amostras foram dispostas em embalagem plástica individual, não contendo qualquer informação sobre sua origem, informação nutricional e data de fabricação (Figura 3A e 3B). Durante o transporte, as amostras foram mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo, com o intuito de evitar que fatores externos interferissem no produto e nos resultados das análises microbiológicas.

As análises das amostras foram divididas em duas etapas: a primeira, para detecção de coliformes totais e termotolerantes, foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto Educacional Santa Catarina, Faculdade Guaraí, Campus de Guaraí/TO; a segunda etapa, para confirmação bioquímica dos isolados bacterianos e realização dos antibiogramas, foi executada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, Fernandópolis – São Paulo.



Figura 3 (A, B): comercialização do queijo na feira livre.  
Fonte: Autora.

### 3.4 Preparo da Amostra

De cada amostra de queijo frescal tipo artesanal, foram colhidos assepticamente 25g (Figura 4), os quais foram triturados e transferidos para frasco Erlenmeyer com 225 mL de água salina peptonada estéril (0,1%). Esta diluição correspondeu a uma proporção de 1:10, ou seja, 10mL do homogeneizado continha um mililitro da amostra. A partir da diluição inicial, a diluição 1:100 foi feita retirando-se 1 mL da diluição inicial e adicionando-se a 9,0 mL do diluente (água salina peptonada 0,1%) em um segundo tubo; a diluição 1:1000 foi preparada retirando-se 1mL da diluição 1:100 e adicionado a 9,0 mL do diluente em um terceiro tubo, observando se sempre o uso do mesmo diluente. Estas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram usadas para posterior procedimento microbiológico. O experimento foi conduzido em triplicata.

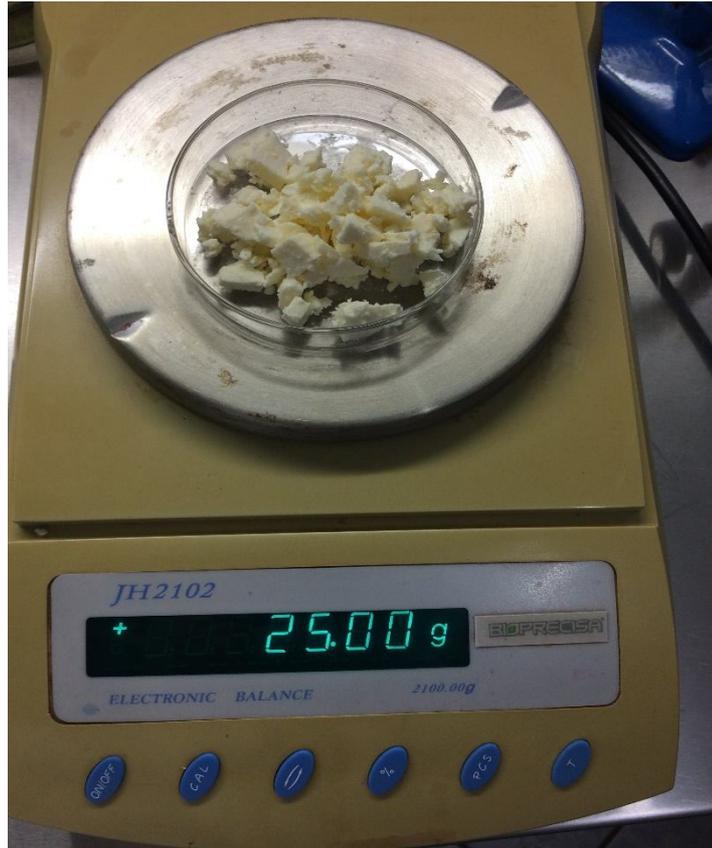


Figura 4 - Amostra sendo pesada na balança dentro do fluxo laminar

### 3.5 Análise Microbiológica

#### 3.5.1 Técnica de Tubos Múltiplos

A quantificação dos coliformes totais e termotolerantes foi designada pelo método do Número Mais Provável (NMP) com auxílio da tabela de Hoskins citado por Silva et al., (2007). A mesma deu-se em duas fases: determinação do NMP/g de Coliformes Totais e termotolerantes (Anexo A).

Para obter dados fidedignos sobre a pesquisa de queijos comercializados e no sentido de evitar contaminação dos meios, adotaram-se medidas que evitassem contaminação externa, para isso todas as etapas foram executadas no interior da capela de fluxo laminar. Em relação as vidrarias, foram esterilizadas em autoclaves a uma temperatura de 121° C por um período de 20 minutos e secas em estufas à 170° C por um período de 1 hora, garantindo maior condição asséptica do material. Sobre o manuseio das hastes e alças de platinas, para garantir sua esterilidade, foram flambadas em bico de Bunsen, durante o tempo necessário para que elas ficassem rubras.

Para obtenção dos números mais prováveis (NMP/g) de Coliformes Totais utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, na qual foram utilizados nove tubos, agrupados na sequência de três em três, conforme a diluição, e posteriormente agrupados para fazer a contagem utilizando a Tabela do Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou ml, e respectivos intervalos de confiança 95% (figura 5).

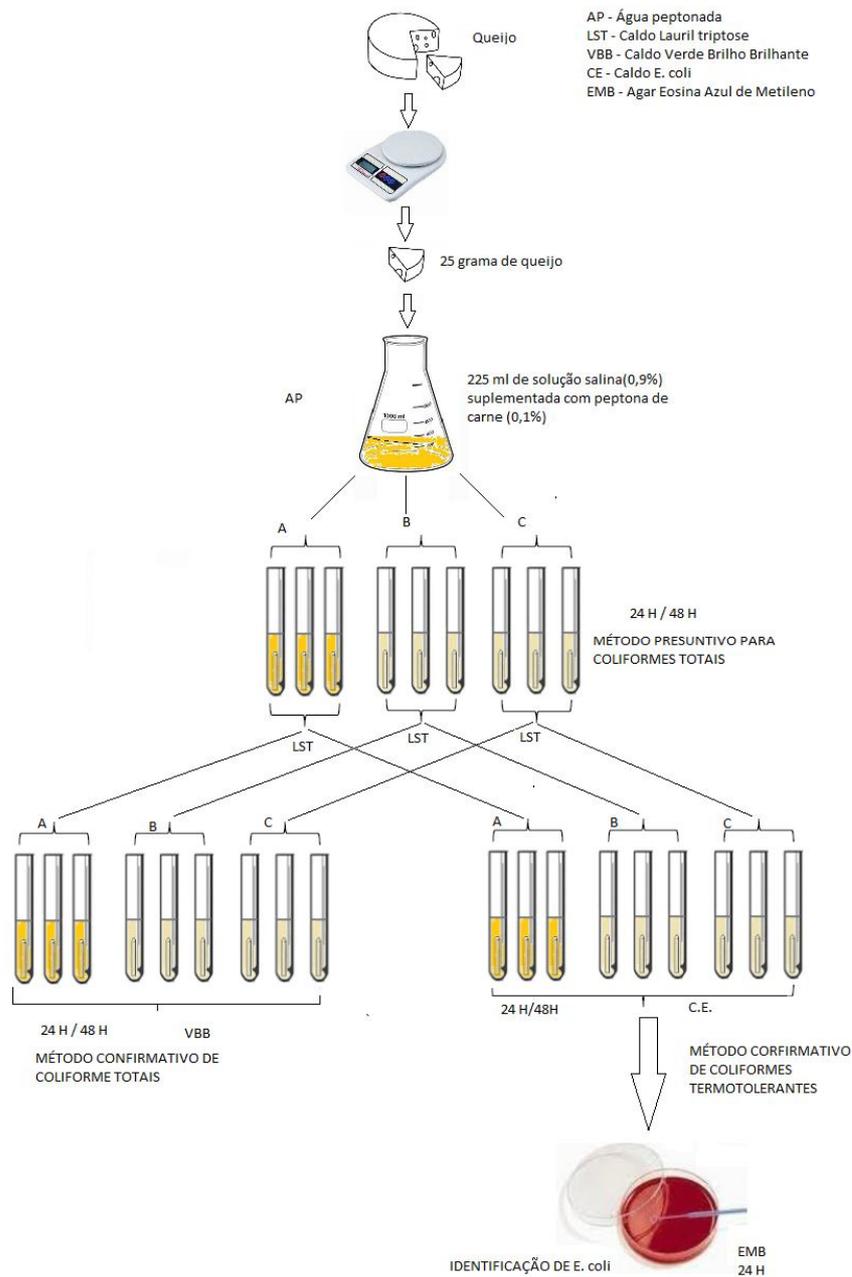


Figura 5 - NMP/g ou mL de coliformes a 35°C e 45°C, e confirmação de Escherichia coli. Fonte: Adaptado de Silva et al., (2010).

As amostras de queijo diluídas em água peptonada (0,1%) foram submetidas a teste presuntivo: três alíquotas de três diluições foram inoculadas em uma série de três tubos de Caldo

Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição. O LST foi usado para observação do crescimento de microrganismo, e separado aqueles que produziram gás a partir da lactose, no período entre 24 a 48h de incubação a 35°C, sendo considerado suspeito (presuntiva) de conter coliformes (figura 6A) (SILVA et al., 2010).

Para a confirmação dos coliformes totais e termotolerantes, uma alçada de cada tubo considerado suspeito, foi transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *Echerichia coli* (EC), meios seletivos que contendo a lactose. A observação de crescimento com produção de gás nos tubos VB, foi verificada entre o período de 24 a 48h de incubação a 35°C, sendo considerada confirmativa de coliformes totais (figura 6B). O crescimento com produção de gás nos tubos EC, após 24h de incubação a 45,5°C, foi considerada confirmativa da presença de coliformes termotolerantes (Figura 6C) (SILVA et al., 2010). O Experimento foi conduzido em triplicata.

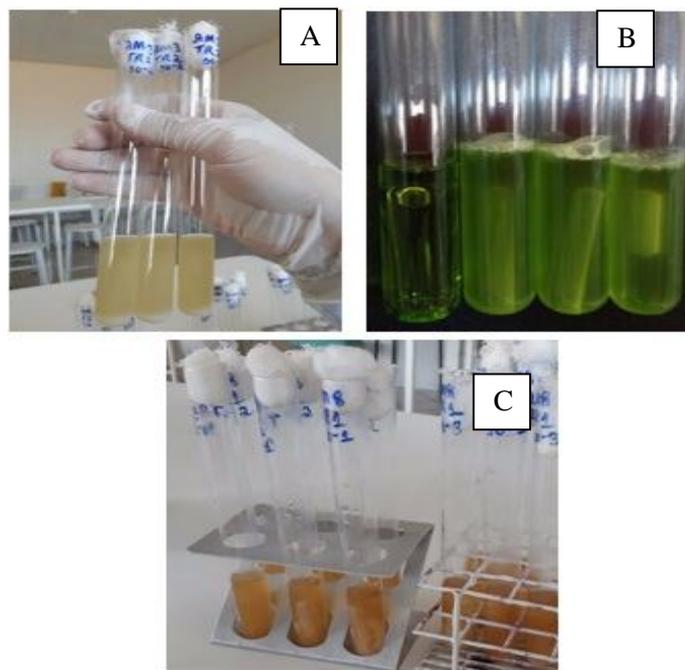


Figura 6 - Método da presença e ausência em meio de cultura específico. A: Lauril Sulfato Triptose-LST, B: Verde Bile Brilhante-VB e C: Caldo Escherichia coli. Fonte: Autora.

Justifica-se a utilização dos dois caldos (VB e CE), uma vez que ambos são utilizados como métodos confirmativos para coliformes totais e termotolerantes

De cada tubo de EC positivo (figura 7A) com produção de gás, estriou-se uma alçada em placa contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (figura 7B) sendo as mesmas incubadas a 35° C por 24 horas, e posteriormente foi observado se houve desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico (figura 7C).

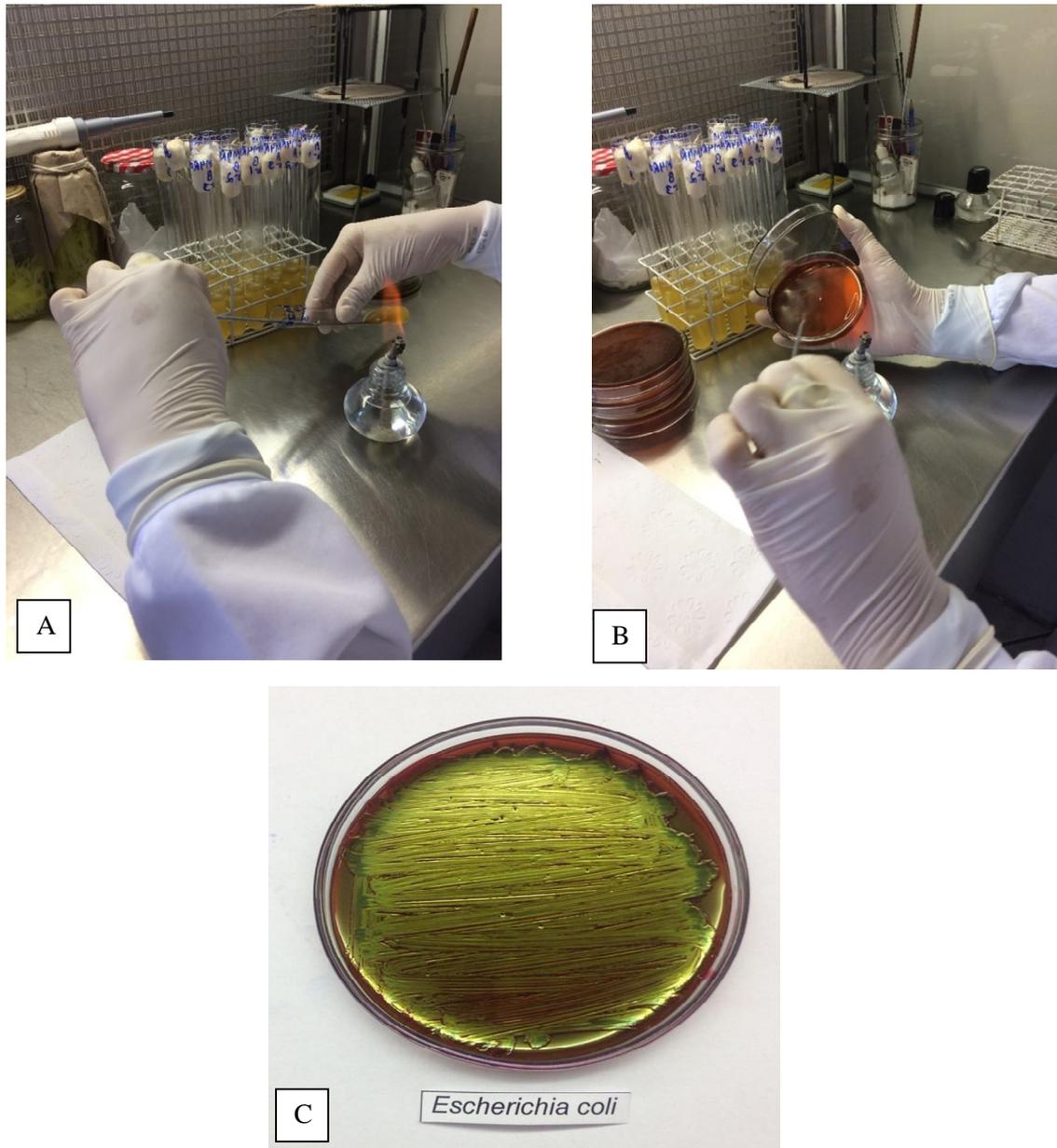


Figura 7 - (A, B,C): Estriamento de amostras positivas em Caldo E. coli em meio Eosina Azul de Metileno e identificação de *Escherichia coli*. Fonte: Autora.

Na sequência do procedimento observou-se o desenvolvimento de colônias típicas de *Escherichia coli* (colônias com brilho metálico ou pretas) e armazenadas em tubos criogênicos (figura 8) e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil em Fernandópolis – São Paulo para serem feitas a confirmação bioquímicas e os antibiogramas.

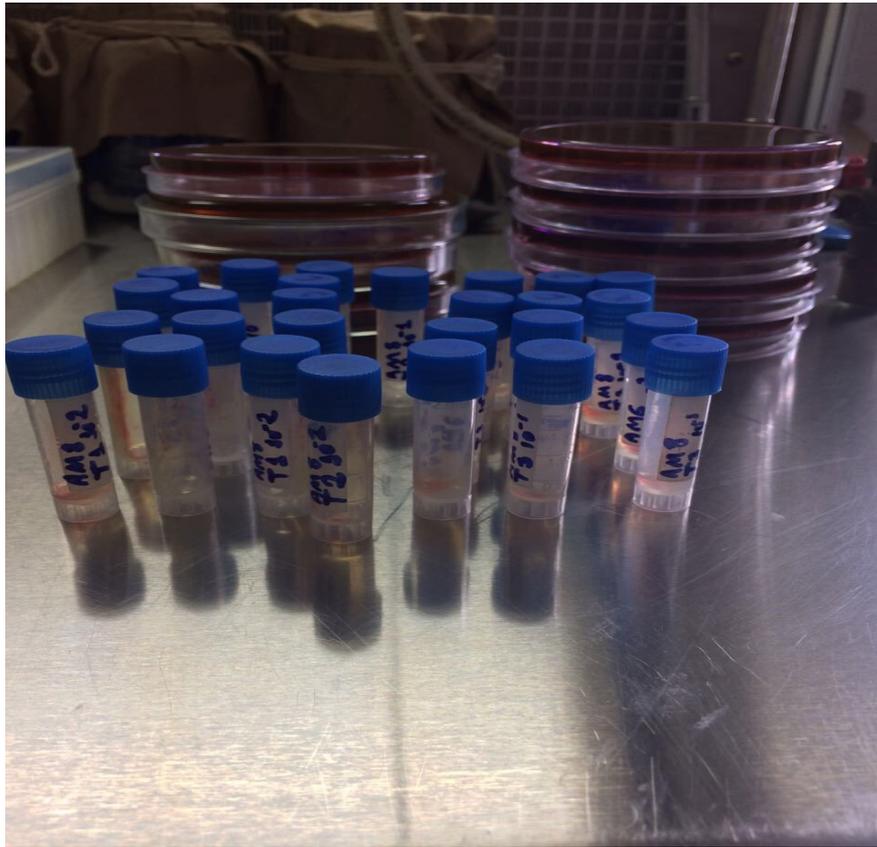


Figura 8 - : Armazenamento de cepas bacterianas em tubos criogênicos. Fonte: Autora.

### 3.6 Confirmação Bioquímica

As culturas positivas foram empregadas para identificação por correlação a aparência colonial, coloração de Gram, reação oxidase, e reações bioquímicas utilizando sistema API 20E (BioMérieur).

### 3.7 Antibiograma

Para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, utilizou-se o método de Kirby Bauer modificado, tal como recomendado pelo Clinical Laboratory Standard Institute (Clinical laboratory).

Foram avaliados os antimicrobianos: tobramicina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetropim, clorafenicol, ceftazidima, ampicilina, amicacina, aztreonam, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, amoxicilina/ácido clavulânico e ceftazolidina. Os resultados foram interpretados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo CLSI.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado pela razão entre o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente e o número de antibióticos ao qual o isolado foi exposto, sendo que o IRMA superior a 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises para coliformes totais (Tabela 1) indicaram um valor mínimo de <3,0 e máximo de >1100, com variação média de 883,9 a 1036. Em relação ao desvio padrão, ocorreu uma variação entre 64 e 144,1, demonstrando uma baixa variação dos valores obtidos em relação à média.

Os resultados obtidos evidenciaram excessiva contaminação microbiológica nos queijos frescal artesanal, verificando-se elevada contagem de coliformes totais, indicando provável ausência de boas práticas de higienização no processo de fabricação e manipulação do alimento. A presença de coliformes totais está associada a práticas inadequadas de higienização durante o processamento e a alta taxa de contaminação está relacionada com ausência de controle higiênico sanitário na produção desse alimento, sendo que quanto maior a quantidade de microrganismos detectada, mais precária é a condição higiênica sanitária do produto (SILVA et al., 2007; KIRANMAYI et al., 2011).

Tabela 1 - Média dos resultados do NMP/g de coliformes totais isolados de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil)

PRODUTOR	MÉDIA	DP	MÁXIMO	MÍNIMO
1	941,0	108,5	>1100	150
2	933,0	111,4	>1100	240
3	912,5	126,4	>1100	35
4	1036,0	64,0	>1100	460
5	1014,0	86,0	>1100	240
6	1019,0	81,0	>1100	290
7	883,9	144,1	>1100	<3,0
8	1036,0	64,0	>1100	460

DP: desvio padrão.

Fonte: a autora.

A determinação de coliformes termotolerantes revelou uma variação média de 663,7 a 1036, com um valor mínimo de < 3,0 e máximo >1100. Em relação ao desvio padrão, ocorreu uma variação entre 64 e 178,1, demonstrando uma baixa variação dos valores obtidos em relação à média dos resultados encontrados nas amostras, conforme tabela 2.

O valor da média das 80 amostras para o número mais provável de coliformes termotolerantes ficaram acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, conforme a resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro 2001 (BRASIL, 2001), que apresenta limite de tolerância para coliformes termotolerantes de  $5 \times 10^2$  NMP/g. Com base neste limite, verificou-se que a média obtida para NMP/g de termotolerantes encontrados nos queijos frescal artesanal estava

fora dos padrões da legislação (Tabela 2), considerados por tanto inadequados para comercialização e, conseqüentemente, ao consumo humano.

Os resultados obtidos na presente pesquisa são semelhantes aos obtidos por Ferreira et al., (2011) que constataram que 70% das amostras de queijo avaliadas apresentaram contagens superiores a legislação vigente de coliformes termotolerantes. Nunes, Alencar e Caldas (2013) verificaram que 13% das amostras de leite e derivados lácteos comercializadas no Distrito Federal foram rejeitadas pelas altas contagens de coliformes termotolerantes, encontradas principalmente em queijos artesanais. Garcia et al., (2016) também observou que 89% dos queijos artesanais comercializados no município de Montes Claros-MG estavam fora dos padrões da legislação vigente brasileira. Assim como Wolupeck et al. (2012), verificaram que 78,18% do queijo artesanal comercializado em Curitiba – PR estava com valores acima do permitido e Santana et al., (2008) constatou que as amostras apresentaram uma presença significativa de alta contagem de bactérias termotolerantes em 80% das amostras analisadas em Aracaju-SE. Essa alta contagem microbiana pode ser atribuída às condições higiênicas e sanitárias inadequadas de produção e da comercialização dos queijos produzidos de maneira artesanal (PINTO et al., 2011).

Tabela 2 - Média de NMP/g de coliformes termotolerantes nos isolados de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil).

PRODUTOR	MÉDIA	DP	MÁXIMO	MÍNIMO
1	782,3	161,9	>1100	7,4
2	792,8	157,4	>1100	<3,0
3	955,0	97,5	>1100	290
4	773,3	139,3	>1100	<3,0
5	880,7	146,2	>1100	<3,0
6	663,7	178,1	>1100	<3,0
7	819,9	147,6	>1100	<3,0
8	1036,0	64,0	>1100	460

Fonte: a autora.

Das 80 amostras avaliadas, 15% estavam dentro dos padrões para coliformes totais e 26,25% para coliformes termotolerantes. No entanto, verificou-se, que 85% apresentaram contagens de coliformes totais e 73,75 % com coliformes termotolerantes acima dos padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 2001). Em 97,5% das amostras foi confirmada a presença de *Escherichia coli* (Figura 9A) e em 2,5% foi identificada a presença de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 9B). E a associação de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas em queijos fabricados por três produtores é apresentada na Figura 9C.

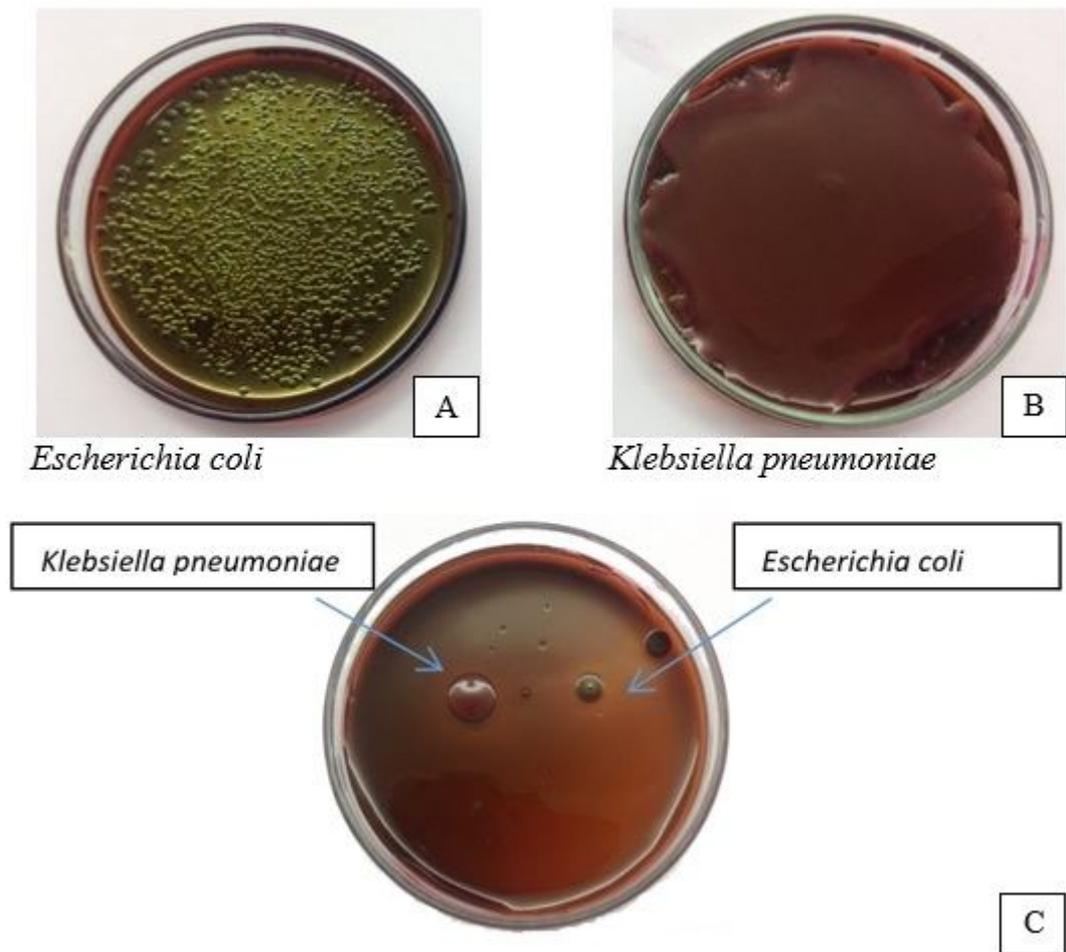


Figura 9 - Colônias típicas de *Escherichia coli* (A), apresentando coloração verde metálico em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), *Klebsiella pneumoniae* (B), e associação de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (C), isoladas de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil). Fonte: Autora.

As bactérias de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem eventualmente causar doença ao hospedeiro ou permanecer como um microrganismo residente com a capacidade de causar infecções oportunistas. Além disso, os genes adquiridos que conferem resistência aos antibióticos podem ser transferidos para a microbiota normal e induzir seleção por antibióticos sendo responsáveis pelo desenvolvimento de um grande número e variedade de infecções (FORSBERG et al., 2012; RASHEED et al., 2014). Além disso, algumas espécies de enterobactérias são consideradas oportunistas em indivíduos hospitalizados e imunodeprimidos (HLOPE & MCKERROW, 2014).

Para avaliação da sensibilidade/resistência aos antibióticos foram avaliadas todas as cepas de *E.coli* (n=78) e de *K. pneumoniae* (n=6) isoladas (Tabela 3) Verificou-se maior porcentagem de cepas de *E. coli* resistentes a Ampicilina (7,69%, n= 6) , seguidos por tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetropim (5,12%, n= 4), e cefotaxima (2,56%

n= 2). Entre as cepas de *E. coli* não foi observado a resistência aos antibióticos aztreonam e cefazolina. Os resultados obtidos evidenciam alta sensibilidade aos antibióticos das cepas de *Escherichia coli* contaminantes dos queijos frescal. Este perfil de bactéria provavelmente está relacionado à produção não extensiva do gado no município, implicando na exígua utilização de antibióticos. Segundo Arenas e Melo (2018) o uso extensivo de antibióticos é uma prática comum para aumentar a produção animal, implicando na contaminação ambiental, de alimentos com traços do antimicrobiano e o surgimento de patógenos resistentes.

Tabela 3 - Perfil de resistência aos antibióticos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de queijo fresco artesanal comercializadas no município de Guaraf -TO.

Antibióticos	Porcentagem de cepas resistentes	
	<i>Escherichia coli</i> (n=78)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)
Aztreonam	0	0
Cefazolina	0	0
Cefepime	1,28	0
Ceftriaxona	1,28	0
Tobramicina	1,28	16,66
Ciprofloxacina	1,28	16,66
Ceftazidima	1,28	16,66
Gentamicina	1,28	50,00
Amoxicilina/ácido clavulânico	1,28	50,00
Amicacina	2,56	50,00
Cefotaxima	2,56	50,00
Cefoxitina	3,84	50,00
Tetraciclina	5,12	50,00
Sulfametoxazol-trimetropim	5,12	33,33
Clorafenicol	5,12	83,33
Ampicilina	7,69	83,33

Fonte: Autora.

As maiores porcentagens de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos foram verificadas para ampicilina e clorafenicol (83,33%, n =5), tetraciclina, amicacina, cefotaxima, cefoxitina, amoxicilina/ácido clavulânico (50%, n=3) e sulfametoxazol-trimetropim (33,33%, n=2).

Todas as cepas apresentaram sensibilidade a aztreonam, ceftriaxona, cefepime e cefazolina; resultados semelhantes obtidos por Guo et al., (2016) em cepas isoladas de diferentes alimentos de origem animal. Os autores observaram resistência contra dezesseis antibióticos, a maior taxa de resistência foi observada para ampicilina (92,3%), seguida por tetraciclina (31,3%), trimetoprim-sulfametoxazol (18,2%) e cloranfenicol (10,1%). Zhang et al. 2018 verificaram que cepas de *K. Pneumoniae*, isoladas em alimentos comercializados na rua,

apresentaram altos níveis de resistência à ampicilina (82,2%), à estreptomicina (11/62, 17,7%) e à piperacilina (16,1%). Estes autores afirmaram que a presença de *K. pneumoniae* multirresistentes a antibióticos e virulentas nos alimentos representa um perigo potencial para a saúde dos consumidores e ressaltam a importância da vigilância sanitária de *K. pneumoniae* em alimentos.

Na presente pesquisa as cepas de *E. coli* e de *K. pneumoniae* foram avaliadas quanto ao índice de multirresistência a antimicrobianos (IRMA > 0,20). As cepas de *E. coli* evidenciaram baixa multirresistência (IRMA= 0,25, figura 10), correspondendo a 3,8% (n=3). Os resultados obtidos evidenciaram que 84,8% (n=65) das cepas de *E. coli* foram sensíveis a todos os antibióticos avaliados (IRMA= 0), constatando-se baixa incidência de resistência a estes antimicrobianos.

Portanto, a vigilância e o monitoramento de bactérias resistentes a medicamentos em alimentos é importante para implementar as estratégias de controle direcionadas e selecionar medicamentos eficazes para o tratamento (ZHANG et al., 2018).

Em relação as cepas *K. pneumoniae* verificou-se que 100% apresentou IRMA de 0,31 (50%) e 0,37 (50%) na figura 3. Os alimentos, principalmente os de origem animal, são reservatórios de *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. Estas bactérias podem ter o potencial de se tornar um risco para a saúde pública, sendo necessárias estratégias de monitoramento e prevenção aprimoradas para melhorar o controle do surgimento e a transmissão destes microrganismos (GUO et al., 2016).

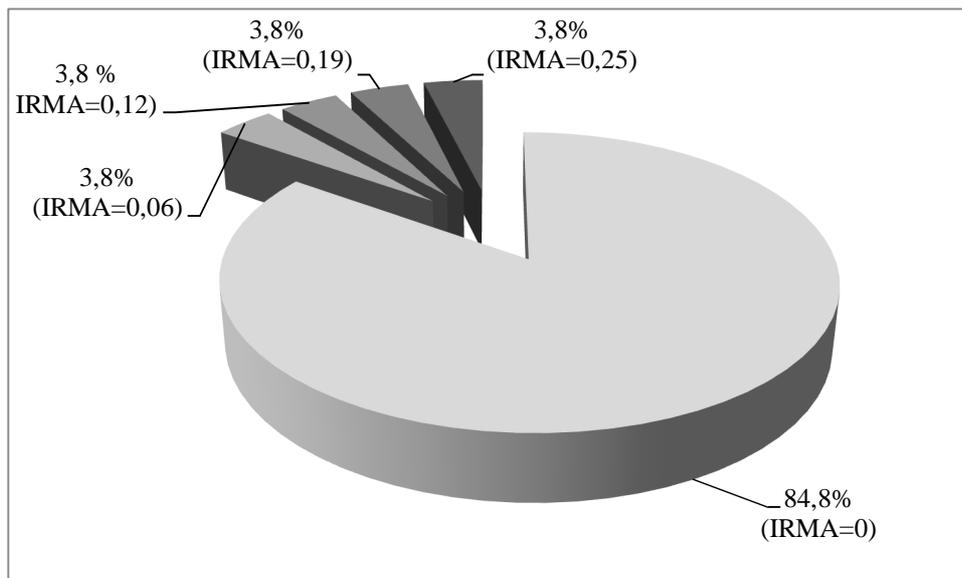


Figura 10 - Frequência de Escherichia coli multirresistentes (IRMA > 0,20), isoladas de queijo fresco artesanal comercializados no município de Guarái -TO. Fonte: a autora.

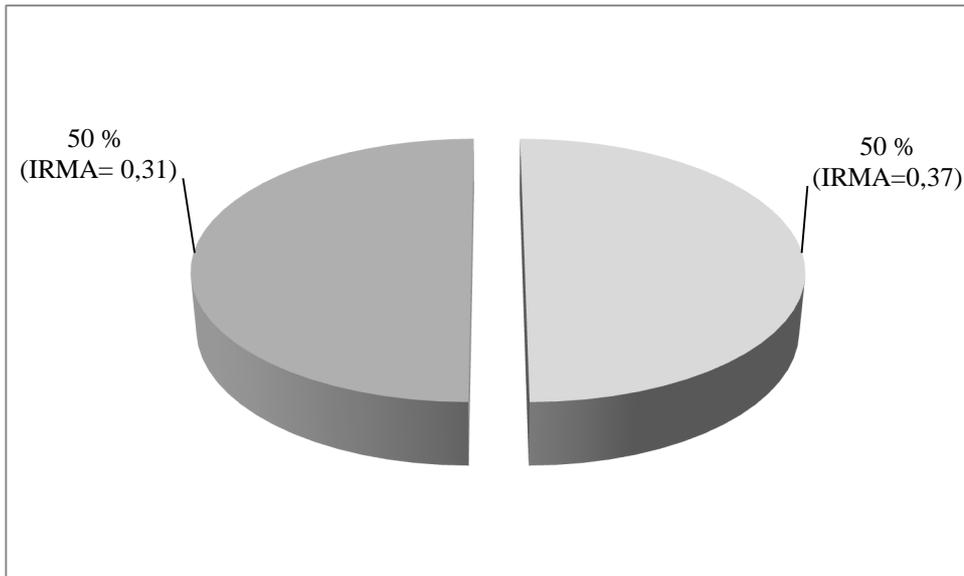


Figura 11 - Frequência de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes (IRMA > 0,20), isoladas de queijo fresco artesanal comercializados no município de Guaraí -TO. Fonte: a autora.

Diante dos resultados obtidos evidencia-se um problema de saúde pública devido à falta de boas práticas durante o processo de produção, presumindo que os queijos frescal artesanais comercializados pelos produtores na feira livre de Guaraí, no período da presente pesquisa, apresentaram alta contaminação por coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* o que inviabiliza o seu consumo.

Portanto, é possível questionar a qualidade da matéria prima, os métodos empregados na fabricação e propor um conjunto de normas para adoção de boas práticas de higienização para produção do queijo frescal artesanal no município. Neste contexto, a segurança alimentar pode ajudar a prevenir e melhorar a saúde da população, assim, a higiene continua a ser um ponto-chave na luta contra doenças infecciosas, especialmente nos países em desenvolvimento (MOUSSÉ et al., 2016).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de queijos apresentaram baixa qualidade microbiológica, indicando deficiência das condições higiênicas sanitárias, representando um risco potencial a saúde pública.

Diversas cepas de *Escherichia coli* apresentaram alta sensibilidade aos antibióticos testados e um índice de multirresistência baixo, enquanto que todas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* evidenciaram multirresistência.

Diante do exposto, percebe-se que 100% das cepas identificadas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram sensíveis aos antibióticos Cefazolina e Aztreonam.

Os resultados desta pesquisa também demonstraram que, a obtenção de leite de qualidade na propriedade rural está intimamente relacionada com as práticas de higiene sanitária na ordenha e manipulação da matéria prima, o que exige a mudança de comportamento do produtor e de seus funcionários.

De um modo geral, verificou-se que os produtores necessitam de um maior apoio em relação assistência técnica, promoção de estímulos à qualidade e formação continuada sobre riscos à saúde advindos da falta de qualidade do produto.

Diante destas observações, a adoção de ações de boas práticas de higienização é de suma importância aos produtores de laticínios de pequeno porte para garantir as melhorias dos queijos comercializados no município de Guaraí – TO como uma ferramenta de qualidade dos produtos e segurança dos consumidores.

Por fim, medidas devem ser adotadas para controle do uso indiscriminado de diversos antibióticos no tratamento terapêutico, evitando o surgimento de bactérias multirresistentes. Além disso, permite rastrear casos de susceptibilidade aos antimicrobianos em queijos artesanais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. 2014.** Disponível em: <http://www.abiq.com.br>. Acesso em: 10 de maio. 2018.
- ALBUQUERQUE, H. N. **Condições higiênico-sanitárias do comércio informal de alimentos na Rua Maciel Pinheiro, Campina Grande-PB.** IV Congresso de Pesquisa e Inovação da rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica Belém-PA, 2009. Disponível em: [http://connepi2009.ifpa.edu.br/connepianais/artigos/19\\_3\\_2643\\_1262.pdf](http://connepi2009.ifpa.edu.br/connepianais/artigos/19_3_2643_1262.pdf). Acesso em: 27/06/2018.
- ALENCAR, M. P. I.; SILVA, J. M.; VIDAL, M. E.; VANDESMET, L. C. S. *Klebsiella pneumoniae*: uma revisão bibliográfica. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2017.
- ALLGAYER, A. N.; SCHIRMER, H.; CASTELAN, J. A. Agreement of results of the BD Phoenix system and manual biochemical tests in the identification of Enterobacteriaceae from clinical samples. **Clinical and Biomedical Research**, v. 35, n. 01, p.43-48, 2015.
- ANDRADE, Á. F. **Avaliação da Qualidade do Queijo Artesanal Produzido e Comercializado na região de Gurupi – TO.** 2012 TCC (graduação) – Curso de Agronomia da Universidade federal do Tocantins, Gurupi, 2012.
- ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; LONGO, J.M.; CLÍMACO, E. C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M. A.; DEL PELOSO, P. F.; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; PAULA, M. C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A. L.; COQUE, T. M. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, 2011.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORADTO, A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- ARENAS, N. E.; MELO, V. M. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. **Infectio**, v. 22, n. 2, p. 110-119, 2018.
- BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. L. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, p. 549-552, 1996.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos.** Dissertação de Mestrado – Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013. 42f.

BARBOSA, S. B. P., JATOBA, R. B.; BATISTA, A. M. V. **A Instrução Normativa 51 e a Qualidade do Leite na região nordeste e nos estados do Pará e Tocantins.** In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 3.2008, Recife. Anais... Recife: CCS. Gráfica e editora, p. 25-32. 2009.

BETTEGA, J. M. P. R.; MACHADO, M. R.; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C. A. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 950-954, 2006.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 42- 51, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001a. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p.1-54. Brasília: 2001.

BRASIL. Decreto n. 30, 691, alterado pelos Decretos n. 1,255 de 25-06-62, n. 1236 de 02-09-94, n. 1.812 de 08-02- 96 e n. 2.244 de 04-06-97. **Aprova o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA).** Diário Oficial da União de 5 de julho de 1997, seção I, p. 11555. Brasília, 1997.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.** Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Rio de Janeiro, DF, 7 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 57, 15 de dezembro de 2011.** Diário Oficial da União, Brasília, 16 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 ago. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011.** Diário Oficial da União, Brasília, 16 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado.** Brasília, DF, 29 dez. 2011. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996.** Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa n.51, de 18 de Setembro de 2002.** Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite. Brasília; 2002. 48p. (Instrução Normativa n.51, 2002).

BRASIL. Portaria n° 146 de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. Diário Oficial da União. Brasília, 11 de março de 1996.

BRITO, L. G.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; ROCHA, R. B.; FIGUEIRO, M. M.; SILVA, W. C.; CARVALHO, G. L. O.; SILVA, J. A.; SOUZA, G. N. Avaliação da qualidade composicional e da saúde da glândula mamária de rebanhos bovinos localizados na bacia leiteira de Ji-Paraná e Rolim de Moura. (**Comunicado Técnico**) Rondônia: Embrapa, Porto Velho, 2011.

CASTRO, K. A.; LIMA, S. K. A.; AZEVEDO P. A. I.; ORSINE, J. V. C. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos prato e mussarela. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1237-1250, 2014.

CHAKROBORTY, B.; DUTTA, S. K.; CHAUDHURI, P. R.; SANTRA, R. Community acquired urinary tract infection in pediatric age-group with changing trends of antibiotic resistance pattern over 3 years: a clinico-epidemiological study. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 30-35, 2017.

CHALITA, M. A. N. O consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto. **Revista de Economia e sociologia Rural**, Piracicaba, v.50, n.3, p.545-562, 2012.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 6, 14 p., 2009.

CHAURET, C. Survival and control of *Escherichia coli* O157: H7 in foods, beverages, soil and water. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 593-601, 2011.

CHEN, C. Y.; CHEN, Y. H.; LU, P. L., LIN; W. R.; CHEN, T. C.; LIN, C. Y. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 3, p. 228–236, 2012.

CLARK, D. P.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Artmed, Porto Alegre, RS, v. 1160, 2010.

CORREA L.; MARTINO, M. D. V.; SIQUEIRA, I.; PASTERNAK, J.; GALES, A. C.; SILVA, C. V. A Hospital-Based Matched Case-Control Study to Identify Clinical Outcome and Risk Factors Associated With Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection. **BMC Infect Disease**, v. 13, n. 80, p.1-8, 2013.

CRUZ, F. T. **Produtores, consumidores e valorização de produtos tradicionais**: um estudo sobre a qualidade dos alimentos a partir do caso do queijo Serrano dos Campos de Cima da Serra-SC. 2012. 292 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DANTAS, D. S.; ARAÚJO, A. M.; SANTOS, J. O.; SOUSA SANTOS, R. M.; RODRIGUES, O. G. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

DAVIS, G. S.; PRICE, L. B. Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 128-135, 2016.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 365-367, 2010.

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

DIAS, N. L. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a meticilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas – MG**, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. 53 f. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/>. Acesso em: 22 maio.2018.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from artisan Minas cheese from the Serra da Canastra, MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v.33, n.2, p.271- 275, 2013.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, p.26-34, 2012.

DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. A. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the- art and future directions. **Clinical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 40-63, 2011.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; FRANÇA SANTOS, G. C.; SANTOS SOUZA J.; SOUSA BERNARDES F.; SILVA, I. P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 55-67, 2016.

FAVA, L.W.; HERNANDES, J.F.M.; PINTO, A.T.P.; SCHMIDT, V. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, p.1-6, 2012.

FEITOSA, T.; BORGES, M. D. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. D. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, 2003.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: **Chapter 4A**, Bacteriological Analytical Manual on line. Food and Drug Administration –FDA/CFSAN, 2011. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>>. Acesso em: 15 abril 2018.

FERENS, W. A.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 4, p. 465-487, 2011.

FERREIRA, J. S.; CERQUEIRA, E. S.; CARVALHO, J. S. C.; OLIVEIRA, L. C.; COSTA, W. L. R.; ALMEIDA, R. C. C. Conhecimento, atitudes e práticas em segurança alimentar de manipuladores de alimentos em hospitais públicos de Salvador, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 37, Supl. 1, p. 35-55, 2013.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. D. C. M.; CARRAZZA, L. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, p. Art. 1019-1026, 2011.

FONTANETTI, M. M.; GHEDIN G. L.; DEBONI C. N.; GONZALEZ, L. H.; DIAS T. C. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, 2015.

FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O.; DANTAS, G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1107-1111, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Artmed Editora, 2013. p.496.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamental of cheese Science**. Gaithersburg: NA Aspen Publication, 2000. 587p.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati-PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 6, n. 8, p. 35-49, 2009.

GARBATI, M. A.; AL GODHAIR, A. I. The Growing Resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the Need to Expand Our Antibigram: Case Report and Review of the Literature. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 8-10, 2013.

GARCIA, J. K. S.; PRATES, R. P.; FARIAS, P. K. S.; GONÇALVES, S. F.; SOUZA, C. N. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 58-65, 2016.

GASPAROTTO, P. H. G.; ROCHA, C. S.; GRECELLÉ, C. B. Z. Quantificação de coliformes totais e fecais pela técnica do nmp em amostras de água do município de Jí-Paraná. **Ciência & Consciência**, v. 2, 2008.

GIAKKOUPIS, P.; PAPAGIANNITIS, C. C.; MIRIAGOU, V.; PAPPAS, O.; POLEMIS M.; TRYFINOPOULOU, K.; TZOUVELEKIS, L. S.; VATOPOULOS, A. C. An update of the

evolving epidemic of bla KPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1510-1513, 2010.

GORDON, D. M. The ecology of *Escherichia coli*. In: DONNENBERG, M. (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2ª ed. Londres: Academic Press, 2013. pp. 3-14.

GRACINDO, A. P. A. C.; PEREIRA, G. F. **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: Emparn, 2009.

GRECHI, S. Q. **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos** (dissertação). Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2005.

GUIMARÃES, A. G.; CARDOSO, R. C. V.; AZEVEDO, P.F.; MENESES, R. B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.2, p.259-265, 2012.

GUO, Y.; ZHOU, H.; QIN, L.; PANG, Z.; QIN, T.; REN, H.; ZHOU, J. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153561, 2016.

HAUSER, R **Antibióticos na prática clínica**. São Paulo: Artimed, 2010. p. 4.

HEN, C. Y.; CHEN, Y. H.; LU, P. L.; LIN, W. R.; CHEN, T. C.; LIN, C. Y. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: risk factors, clinical presentation, and outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, n. 3, p. 228-236, 2012.

HLOPE, S. T.; MCKERROW, N. H. Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in a paediatric intensive care unit. **South African Journal of Child Health**, v. 8, n. 4, p. 125-128, 2014.

HU, L.; ZHONG, Q.; TU, J.; XU, Y.; QIN, Z.; PARSONS, C.; ZHANG, B.; HU, X.; WANG, L.; YU, F.; PAN, J. Emergence of blaNDM-1 among *Klebsiella pneumoniae* ST15 and novel ST1031 clinical isolates in China. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 4, p. 373-376, 2013.

HUDSON, C. M.; BENT, Z. W.; MEAGHER, R. J.; WILLIAMS, K. P. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99209, 2014.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Guaraí população 2016**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidades>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.

- KALLEN, A. J.; HIDRON, A. I.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 5, p. 528-531, 2010.
- KIRANMAYI, C. B.; KRISHNAIAH, N.; SUBHASHINI, N.; AMARAVATHI, P.; MAHESWARI, M.; RAMYA, P. PCR analysis of mutton and chicken samples for the presence of Shiga toxigenic *E. coli*. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, 2011.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008. 1465p.
- KÖPPEN, W. **Climatologia**: Con un estudio de los climas de la tierra. Fondo de Cultura Economia, Mexico-Buenos Aires, 1948.
- KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805-815, 2010.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.
- LISITA, M. O.; PORTO, E.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SANT'ANA, A. S. Monitoramento Microbiológico no Processamento do Queijo Minas Frescal. **Revista Leite & Derivados**, São Paulo, v. 110, n. 17, p. 82-9, 2009.
- LITTLE, C. L.; AMAR, C. F. L.; AWOFISAYO, A.; GRANT, K. A. Hospital-acquired listeriosis associated with sandwiches in the UK: a cause for concern. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 82, p. 13-18, 2012.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 2013.
- MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. **Fundamentos de metodologia científica**. São Paulo: Atlas, 2011.
- MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Determinação de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 6, n. 2, p. 842-851, 2012.
- MARTINS, J. M.; LEMPK, M. W.; FELÍCIO, B. A.; PINTO, M. S.; BRANDI, I. V. Qualidade Minas artesanal: aspectos produtivos, físico-químicos, microbiológicos e legislação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.34, n.273, p.90-98, 2013.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 547-51, 2009.

MELO, F. D., DALMINA, K. A., NUNES PEREIRA, M., VARGAS RAMELLA, M., THALER NETO, A., KNACKFUSS VAZ, E., & FERRAZ, S. M. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1152, 2013.

MENESES, R. B. D.; CARDOSO, R. D. C. V.; GUIMARÃES, A. G.; GÓES, J. Â. W.; SILVA, S. A. D.; ARGÔLO, S. V. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 381- 392, 2012.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)**, v. 28, n. 1, p. 2011.

MILANI, M. P. **Qualidade do leite em diferentes sistemas de produção, anos e estações climáticas no noroeste do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado) Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2011. 69 f.

MILANOVIĆ, V.; OSIMANI, A.; AQUILANTI, L.; TAVOLETTI, S.; GAROFALO, C.; POLVERIGIANI, S.; TURRONI, S. Occurrence of antibiotic resistance genes in the fecal DNA of healthy omnivores, ovo-lacto vegetarians and vegans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 9, p. 1601098, 2017.

MOAYEDNIA, R.; SHOKRI, D.; MOBASHERIZADEH, S.; BARADARAN, A.; FATEMI, S. M.; MERRIKHI, A. Frequency assessment of  $\beta$ -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. **Journal of research in Medical Sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. Suppl 1, p. S41, 2014.

MOREIRA M. A. S.; RODRIGUES, P. P. C. F; TOMAZ, R. S.; MORAES, C. A. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**. [online]., v.40, n.2, p. 241-247, 2009.

MORIEL, D. G.; ROSINI, R.; SEIB, K. L.; SERINO, L.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *Escherichia coli*: great diversity around a common core. **MBio**, v. 3, n. 3, p. 118-112, 2012.

MOURA, M. D. R. S. D.; MELLO, M. J. G. D.; CALÁBRIA, W. B.; GERMANO, E. M.; MAGGI, R. R. S.; CORREIA, J. D. B. The frequency of *Escherichia coli* and its sensitivity to antimicrobials in children aged under five years admitted to hospital for treatment of acute diarrhea. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2012.

MOUSSÉ, W.; BABA-MOUSSA, F.; ADJANOHOON, A.; NOUMAVO, P. A.; SINA, H.; ASSOGBA, S.; BABA-MOUSSA, L. Virulence profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from street foods in Benin. **International Journal of Biotechnology and Food Science**, v. 4, n. 3, p. 52-64, 2016.

MUNIR, M.; XAGORARAKI, I. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, n. 1, p. 248-255, 2011.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 3515-3522, 2013.

NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, R. E.; CUNHA, C. P.; CORBIA, G. C. A. Estudo transversal sobre alguns fatores de risco na contaminação natural de coliformes fecais em queijo minas frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 86, p. 55-59, 2001.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, p. 143-148, 1999.

NICOLINI, P.; NASCIMENTO, J. W. L.; GRECO, K. V.; MENEZES, F. G. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 2013.

NUNES, M. M.; ALENCAR MOTA, A. L. A.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013.

OLANIRAN, A. O.; NAICKER, K.; PILLAY, P. Toxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*: Classification, pathogenesis and virulence determinants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n.4, p. 94-100, 2011.

OLIVAL, A. A., SPEXOTO, A. A., CAMPOS, S. F. D., FERREIRA, F., FONSECA, L. F. L., SANTOS, V. M., DIAS, A. R. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga-São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n.102/103, p. 35-40, nov.- dez., 2002.

OLIVEIRA, C. J. B.; LOPES JUNIOR, W. D.; QUEIROGA, R. C. R. E.; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S.; PEREIRA, W. E.; GEBREYES, W. A. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiaria northeastern Brazil. **Jornal of Dairy Science**, v. 94, n.6, p 3166-3175, 2011.

OLIVEIRA, J. **Uso de critérios para avaliação da qualidade microbiológica de um laticínio**. 2016. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2016. 52 f.

OLIVER, C.; MORENO, J.; MISTIER, L.; LELA, P. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela. Pirassununga. **Revista Higiene Alimentar**, 2008. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0002.htm>>. Acesso em: 09 abril. 2018.

OMOREGIE, R.; IGBARUMAH, I. O.; EGBE, C. A.; OGEFERE, H. Urinary tract infections among the elderly in Benin City, Nigeria. **Fooyin Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 3-4, p. 90-93, 2010.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – (WORLD HEALTH ORGANIZATION–WHO). **ANTIMICROBIAL RESTANCE: Global Report on Surveillance**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: Geneva, Switzerland. 2014.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C. F.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2008.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 342-347, out./dez. 2009.

POLLINI, S.; MARADEI, S.; PECILE, P.; OLIVO, G.; LUZZARO, F.; DOCQUIER, J. D.; ROSSOLINI, G. M. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01953-12, 2012.

PRESTES DE SOUZA, A.; HONORATO, L. A.; ULLER GÓMEZ, C.; SILVA CARDOSO, C.; HÖTZEL, M. J. Construção e uso de indicadores para avaliação do manejo da ordenha: uma proposta metodológica participativa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 911-917, 2014.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n. 2, p.538-544, Março, 2013.

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TEKLEMARIAM, Z.; JAMIL, K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 341-346, 2014.

REBELO, A. G. **Queijos: notas sobre queijos regionais da Beina**. Lisboa: coleção Agros, 1983. 220p.

REIS, C. B. M.; BARREIRO, J. R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of somatic cell counted mastitis pathogens on Milk composition in Gyr cows. **Veterinary Research**, Cambridge, v.9, p.67, 2013.

RICHARDSON, R. J. **Pesquisa Social: Métodos e Técnicas**. 3ª ed. 11. reimpressão. São Paulo, Atlas, 2010.

- RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária – MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 57-61, 2016.
- SABIKHI, L., BHONGLE, P. B., SATHISH K. M. H. Farmstead and artisanal cheeses: Adding value to milk at the farmers' doorstep. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 4, 2015.
- SAFE FOOD. **The problem of antimicrobial resistance in the food chain**. 2014. Disponível em: <<http://www.safefood.eu/SafeFood/files/8a/8abb9354-4cc2-49a4-b586-bf0008eb8cf.pdf>>. Acesso em 11 de maio de 2018.
- SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-5, 2006.
- SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE Microbial quality of. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.
- SEBRAE. **Queijos nacionais**. Estudo de mercado Sebrae/ESPM. Série mercado. São Paulo: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2008, 34 p.
- SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação**. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014. 693p.
- SILVA, J. F.; MELO, B. A.; LEITE, D. T.; CORDEIRO, M. F. R.; PESSOA, E. B.; BARRETO, C. F.; FERREIRA, T. C. Análise microbiológica de condimentos comercializados na feira central de Campina Grande – PB. **Agropecuária Científica no Seminário**. v. 9, n. 2, p. 83-87, 2013.
- SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; D’OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, AM M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambuco. **Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 267-276, jan./mar. 2011.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R.; **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo. Varela, 3 ed. p. 552, 2007.
- SILVA, P.H.C. **Qualidade do leite produzido e beneficiado no Distrito Federal (BRASIL) quanto à adequação à Instrução Normativa nº 51/2002**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, 2010. 81f.
- SOLDATELLI, P. P. R.; LORENZINI, E. Estratégias para prevenção da resistência bacteriana: contribuições para a segurança do paciente. **Revista Cuidarte**, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 757-64, nov. 2014.

- SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1015-1020, 2009.
- TEODORO, V. A. M.; MACHADO, G. M. E. M.; TEIXEIRA, S. A.; TELLES, S. S.; PEREIRA, D. A. Importância da implementação de boas práticas na produção de leite para a fabricação de queijos artesanais de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.34, n.273, p.17-29, 2013.
- TOCANTINS**. Decreto nº 5.751, de 7 de dezembro de 2017. Que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal no Estado do Tocantins. Diário Oficial, Palmas, TO, dez. 2017.
- TOCANTINS**. Lei Orgânica nº 221 de 06 novembro de 2009. Criação de inspeção municipal para os produtos de origem animal e vegetal. Diário municipal, Guaraí, TO, nov. 2017.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: ArtMed, 2012, 894p.
- TOZZO, K.; GUIMARAES, I. M.; CAMARGO, C. A. Avaliação microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel – PR. **Higiene Alimentar**, v.29, n.244/245, p.149-154, 2015.
- TRONCO, V. M. Mastite e seu diagnóstico no leite. In: **manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. Ed. Santa Maria: editora UFSM, v.10, p.157-166, 2010.
- TSAI, M. H.; CHU, S. M.; HSU, J. F.; LIEN, R.; HUANG, H. R.; CHIANG, M. C.; HUANG, Y. C Risk Factors and Outcomes for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia in the NICU. **Pediatrics**, p. peds. 2013-1248, 2014.
- VAN ELSAS, J. D.; SEMENOV, A. V.; COSTA, R.; TREVORS, J. T. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME Journal**, v. 5, n. 2, p. 173, 2011.
- VENTURINI, C. E. P. **A Geografia do Leite Brasileiro**. 2014. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/a-geografia-do-leitebrasileiro-87327n.aspx>>. Acesso em: 07 de março. 2018.
- VISOTTO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; PRADO, S. P. T.; BERGAMINI, A. M. M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.
- VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ª Edição, Belo Horizonte – MG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- VUOTTO, C.; LONGO, F.; BALICE, M. P.; DONELLI, G.; VARALDO, P. E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.

- WINK, M. Medicinal Plants: A Source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12771-12791, 2012.
- WOLUPECK, H. L.; ROSSA, H. C. R. L. S.; BIASI, R.; MACEDO, R. E. F. Assessment of the microbiological quality of Minas frescal cheese commercialized in the city of Curitiba, Parana State, Brazil at 10 years' interval (1999 and 2009). **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 10, n. 3, p. 243-252, 2012.
- YAO, B.; XIAO, X.; WANG, F.; ZHOU, L.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 107-112, 2015.
- ZACARCHENCO, P. B.; SILVA, R. P.; BUENO, C. R. F.; AMARAL, A. M. P. **Tecnologias para industrialização do soro de leite**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 12., 2013, Porto Velho. Anais... Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2013.
- ZHANG, S.; YANG, G.; YE, Q.; WU, Q.; ZHANG, J.; HUANG, Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 289, 2018.
- ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. **Diagnóstico da Pecuária de Leite Nacional**. 2011. Disponível em: <[http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/Plano\\_Pecuario\\_2012.pdf](http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/Plano_Pecuario_2012.pdf)>. Acesso em: 10 abril.2018.

## ANEXO A

Tabela 1. Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou mL e respectivos intervalos de confiança 95%.

Número de Tubos			NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	--	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	--