

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARIA DIGIAN DE OLIVEIRA ARRUDA

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Listeria*
***monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO DE COALHO DURANTE**
ARMAZENAMENTO SOB BAIXAS TEMPERATURAS

JOÃO PESSOA – PB

2016

MARIA DIGIAN DE OLIVEIRA ARRUDA

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO DE COALHO DURANTE ARMAZENAMENTO SOB BAIXAS TEMPERATURAS

JOÃO PESSOA – PB

2016

MARIA DIGIAN DE OLIVEIRA ARRUDA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO
DE *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* EM
QUEIJO DE COALHO DURANTE ARMAZENAMENTO
SOB BAIXAS TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA – PB

2016

A779a Arruda, Maria Digian de Oliveira.

Avaliação da sobrevivência e crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho durante armazenamento sob baixas temperaturas / Maria Digian de Oliveira Arruda. - João Pessoa, 2016.

92 f.: il. -

Orientador: Evandro Leite de Souza.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Queijo de Baixa Maturação.
3. Comportamento Microbiano. 4. *Listeria spp.*
5. *Staphylococcus spp.* 6. Segurança de Alimentos. I. Título.

UFPB/BC

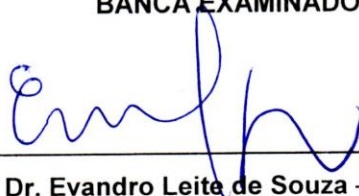
CDU: 664(043)

MARIA DIGIAN DE OLIVEIRA ARRUDA

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO DE COALHO DURANTE ARMAZENAMENTO SOB BAIXAS TEMPERATURAS

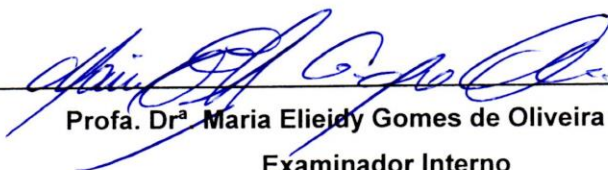
Dissertação aprovada em 19 / 09 /2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/CCS/UFPB

Orientador



Profa. Drª Maria Elieidy Gomes de Oliveira – UFPB

Examinador Interno



Profa. Drª. Lúcia Raquel Ramos Berger – PPGCN/UFPB

Examinador Externo

Prof. Drª. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga – DN/CCS/UFPB

Examinador Suplente Interno

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior – DBM/CCEN/UFPB

Examinador Suplente Externo

A Deus,
pela saúde para a realização desse trabalho.

Aos meus Pais, in memoriam
que me despertaram o gosto pelos estudos.

Ao meu esposo, José Arruda,
pelo amor, dedicação, paciência e respeito.

Aos meus filhos, Marília e Davi,
pelo amor e colaboração recebidos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pelo seu amor incondicional, por me conceder, além da vida, fé, saúde, forças, por guiar minhas escolhas e iluminar meus passos.

À UFPB e ao Programa PPGCTA sob a coordenação dos professores Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva e Dr.^a Rita de Cássia Ramos do E. Queiroga. A toda equipe de professores, ex-coordenadoras professoras Dr.^a Marta Suely Madruga e Dr.^a Marciane Magnani e, a secretária Lindalva Nóbrega. Servem como exemplo de competência, afetividade, desempenho e dedicação.

Ao meu orientador, o prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pela orientação especial, por todo tempo disponibilizado, pela dedicação, gentileza e por possibilitar todos os recursos necessários para a realização deste trabalho. Muitíssimo obrigada.

Aos meus pais, Alcides de Oliveira Melo e Maria Mesquita, *in memoriam*, por despertarem o gosto pelos estudos.

Ao meu esposo, José Arruda, e aos meus filhos, Marília e Davi, por todo amor recebido, apoio e compreensão.

Aos membros da banca examinadora, Dr.^a. Lúcia Raquel Ramos Berger, profa. Dr.^a. Maria Elieidy Gomes de Oliveira, prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior e profa. Dr.^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga, por terem aceitado o convite, por toda dedicação e por contribuírem de forma tão significativa para melhoria deste trabalho.

Aos professores, Dr. Adalberto Coelho e Dr. Lauro Santos Filho, do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS/UFPB, pelo incentivo e apoio.

Ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB pelo apoio.

À professora, Dr.^a Maria Lúcia da Conceição, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição/UFPB, pelo espírito acolhedor, gentil e humilde.

Aos colaboradores de atividades, em especial, Janaína e Nayara e, aos estagiários, Décio e Hana que muito se empenharam para a realização desse trabalho.

A todas as colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição, pelo acolhimento e apoio, em especial, Jossana, Estefânia, Nayara e Valdenice.

A todos os contemporâneos do PPGCTA 2014, pelos vínculos e amizades construídas.

Aos sorrisos sinceros, parcerias e horas compartilhadas com Adma, Elvira, Erika, Michelly, Nayara e Valdenice.

A todos que contribuíram indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Graças, porém, a Deus que, em Cristo,
sempre nos conduz em triunfo e, por
meio de nós, manifesta em todo lugar a
fragrância do seu conhecimento”.*

(II Coríntios, 2-14).

RESUMO

O queijo de coalho, caracterizado como um queijo de baixa maturação é um alimento típico produzido em vários Estados da região Nordeste do Brasil. Este produto apresenta potencial de atuar como substrato favorável para sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas devido ao elevado pH e teor de umidade quando comparado aos queijos maturados. Alguns estudos têm detectado contagens elevadas de *Staphylococcus aureus* e presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo de coalho, sendo estas bactérias reconhecidas como perigos para a segurança microbiológica de queijos frescos ou de baixa-maturação em vários países. O presente estudo avaliou a sobrevivência e crescimento de cepas de *L. monocytogenes* (ATCC 7644 e ATCC 19115) e *S. aureus* (ATCC 13565 e ATCC 19095), adaptadas a antibióticos específicos, em queijo de coalho ao longo de 14 dias em função do tipo de cepa inoculada, do nível de contaminação inicial (3 e 5 log UFC/g) e da temperatura de armazenamento (7,5 e 12 °C). Ainda, foi avaliada a ocorrência de alterações nos parâmetros físico-químicos das amostras de queijos contaminados ao longo do período de armazenamento. As contagens de ambas as cepas testadas de *L. monocytogenes* e *S. aureus* aumentaram ao longo do período avaliado nas amostras de queijo mantidas a 7,5 ou 12 °C. Ao término do período de armazenamento, o aumento na população de *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi sempre superior a 0,5 e 1 log UFC/g nas amostras mantidas a 7,5 e 12 °C, respectivamente, quando comparadas ao nível de contaminação inicial. O início do aumento na população de *L. monocytogenes* e *S. aureus* ocorreu de forma antecipada quando as amostras foram mantidas a 12 °C. Populações de *L. monocytogenes* de 3,9 - 6,2 e 4,3 - 6,4 log UFC/g, e de *S. aureus* de 4,1 - 6,0 e 4,2 - 6,4 log UFC/g, foram detectadas no 14º dia de armazenamento a 7,5 e 12 °C, respectivamente. Poucas variações nos valores de pH e acidez foram verificadas nas amostras de queijo de coalho ao longo do armazenamento em ambas as temperaturas testadas. Estes resultados indicam que *L. monocytogenes* e *S. aureus* podem sobreviver e se multiplicar em queijo de coalho armazenado a 7,5 ou 12 °C, entretanto o aumento da população destas bactérias ocorre de forma antecipada quando o produto é armazenado a 12 °C. Assim, a adoção de boas práticas de fabricação e o controle rigoroso da temperatura de refrigeração durante o armazenamento são aspectos fundamentais para evitar a contaminação e retardar o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo de coalho, diminuindo, desta forma, os riscos de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos a partir do consumo deste produto.

Palavras-chave: Queijo de baixa maturação. Comportamento microbiano. *Listeria* spp.. *Staphylococcus* spp.. Segurança de alimentos.

ABSTRACT

The coalho cheese characterized as a minimally ripened cheese is a typical food manufactured in various states of the Brazilian Northeast region. This product may be a favorable substrate to the survival and growth of pathogenic bacteria because its high pH and moisture content as compared with ripened cheeses. Some studies have detected high counts of *Staphylococcus aureus* and presence of *Listeria monocytogenes* in coalho cheese samples. These bacteria are well-known hazards for microbial safety of minimally ripened cheeses in various countries. This study evaluated the survival and growth of strains of *L. monocytogenes* (ATCC 7644 and ATCC 19115) and *S. aureus* (ATCC 13565 and ATCC 19095), which were previously adapted to specific antibiotics, in coalho cheese during 14 days as affected by the type of strain, the dose of contamination (3 and 5 log CFU/g) and the storage temperature (7.5 and 12 °C). Changes in physicochemical parameters in contaminated cheese samples were also assessed over time. The populations of all tested strains were increased by the end of the storage period at 7.5 and 12 °C. The population of *L. monocytogenes* and *S. aureus* assessed increased earlier when the cheese samples were stored at 12 °C. Populations of 3.9 - 6.2 and 4.3 – 6.4 log CFU/g for *L. monocytogenes*, and of 4.1 – 6.0 and 4.2 - 6.4 log CFU/g for *S. aureus*, were detected on the 14th day of storage at 7.5 and 12 °C, respectively. Minor changes in pH and titratable acidity were verified over time in contaminated cheese samples. These results indicate that *L. monocytogenes* and *S. aureus* can survive and grow in coalho cheese stored at 7.5 or 12 °C, but the growth occur earlier when the cheese is stored at 12 °C. Therefore, the adoption of good manufacture practices and strict control of refrigeration temperatures during storage are essential to avoid the contamination and retard the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese decreasing the risks for occurrence of foodborne diseases associated with the consume of this product.

Key-word: Minimally ripened cheese. Microbial behavior. *Listeria* spp.. *Staphylococcus* spp.. Food safety.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a_a	Atividade de água
AMH	Ágar Mueller-Hinton
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactéria ácido láctica
CMH	Caldo Mueller-Hinton
DO	Densidade óptica
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EFSA	European Food Safety Authority
g	Grama
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NA+	Ácido nalidíxico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
Rif+	Rifampicina
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
Str+	Estreptomicina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	QUEIJO DE COALHO: PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE..	13
2.2	PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO	15
2.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO DE COALHO	18
2.4	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EM QUEIJOS E PARTICULARIDADES RELACIONADAS AO QUEIJO DE COALHO	20
2.5	<i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> COMO PATÓGENOS ALIMENTARES	25
2.5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	25
2.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	LOCAL DAS ANÁLISES	34
3.2	AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO	34
3.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO	34
3.4	REATIVAÇÕES DAS CEPAS BACTERIANAS TESTE E ADAPTAÇÃO AOS ANTIBIÓTICOS	35
3.5	PREPARAÇÕES DOS INÓCULOS DAS CEPAS TESTE	36
3.6	PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO, PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO E CONTAGEM BACTERIANA	36
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
	REFERÊNCIAS	39
4	RESULTADOS	69
	ARTIGO	69
5	CONCLUSÕES.....	92

1 INTRODUÇÃO

Desde muito tempo, os alimentos são motivo de preocupação, tanto no que concerne a produção suficiente para a população, como no que diz respeito ao controle de riscos à saúde do consumidor (GRASSI NETO, 2013). As estimativas mais recentes divulgadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem que mais de 200 doenças podem ser provocadas pelo consumo de alimentos ou água contaminados, afetando 600 milhões de pessoas em todo o mundo, e sendo responsáveis por, aproximadamente, dois milhões de mortes a cada ano (WHO, 2015a). Entretanto, a dificuldade de estabelecer relações causais entre a contaminação dos alimentos e a doença resultante ainda contribui de forma significativa para os casos de subnotificação (WHO, 2015a; WHO, 2015b).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm emergido nas últimas décadas como um importante e crescente problema de saúde pública em muitos países (FUSCO; QUERO, 2012; WHO, 2015c; WHO, 2016), sendo as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, o grupo microbiano mais importante como agentes etiológicos de DTA (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; SOSPEDRA et al., 2013; WHO, 2015d; WHO, 2015e). Dentre os diferentes tipos de alimentos, os produtos lácteos têm sido frequentemente implicados em surtos em vários países (AHMED; SHIMAMOTO, 2014; BRASIL, 2015; YOON; LEE; CHOI, 2016), especialmente queijos os (D'AMICO; DRUART; DONNELLY, 2008; BROOKS et al., 2012; ROSSHAUG et al., 2012) devido às contaminações pós-processamento (FOX et al., 2009; FUSCO; QUERO, 2012) e por favorecerem à sobrevivência e multiplicação de micro-organismos patogênicos (NACMCF, 2010; RAKHMAWATI; NYSEN; AERTS, 2014; FDA, 2015; FDA, 2016).

O queijo de coalho, o qual é um alimento típico produzido em vários Estados da região Nordeste do Brasil (FAO, 2007; QUEIROGA et al., 2013), sendo caracterizado como um queijo de baixa maturação e como possuidor de potencial para agir como substrato favorável para bactérias patogênicas devido ao seu elevado pH e teor de umidade quando comparado aos queijos maturados (FREITAS FILHO et al., 2009; NEAVES; WILLIAMS, 2010; EL-BAKRY; SHEEHAN, 2014). Estas características reforçam a necessidade de vigilância por meio do monitoramento dos procedimentos utilizados na sua fabricação e conservação para garantia da segurança microbiológica do produto (NEWELL et al., 2010).

Alguns estudos têm verificado contagens elevadas de *Staphylococcus aureus* ($> 10^3$ UFC/g) e presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo de coalho (SOUZA et al., 2006; MENESES et al., 2012; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013). Estas bactérias estão envolvidas em surtos de DTA em todo o mundo e oferecem maior perigo para a segurança microbiológica de queijos frescos ou de baixa-maturação (KNIGHT et al., 2008; COELHO et al., 2014; PIMENTEL-FILHO et al., 2014; ZELNY et al., 2015). Com isso, apesar de sua popularidade, muitas vezes, o queijo de coalho comercialmente disponível está associado a uma imagem de alimento não seguro (ALMEIDA et al., 2013; DIAS et al., 2015), devido frequente verificação de desacordo com os padrões microbiológicos vigentes (ADAMI et al., 2015; SOUSA JÚNIOR; VANDESMET; MENDES, 2015), vindo a implicar em risco à saúde do consumidor e redução da vida de prateleira.

Embora já se tenha informações na literatura sobre a presença de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em amostras de queijo de coalho (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2015), faltam estudos que avaliem a sobrevivência e o padrão de crescimento destas bactérias quando o produto é mantido sob diferentes condições de armazenamento. Estudos do comportamento de micro-organismos patogênicos em um produto alimentício específico são de importância para revelá-lo como substrato favorável ou não para a persistência e aumento da população microbiana de interesse (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003; FORSYTHE, 2013). Este tipo de estudo, denominado “teste desafio” geralmente complementa o estabelecimento de um risco microbiológico inicialmente revelado em estudos de qualidade microbiológica de um alimento ou grupo de alimentos (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015).

Considerando-se tais aspectos, o presente estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos: i) avaliar a capacidade de sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em amostras de queijo de coalho ao longo de 21 dias em função do tipo de cepa inoculada, do nível de contaminação inicial (3 e 5 log UFC/g) e da temperatura de armazenamento (7,5 e 12 °C); e ii) avaliar a ocorrência de alterações nas características físico-químicas das amostras de queijo de coalho, quando inoculadas com estas bactérias ao longo do período de armazenamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUEIJO DE COALHO: PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE

A legislação sanitária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define o queijo de coalho 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 soro de lácteos, coagulados pela adição física do coalho, enzimas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL, 1996).

O queijo de coalho é caracterizado como um queijo semiduro de consistência elástica, com média (36,0 – 45,9%) a alta umidade (46 - 54,9%), seu teor de gordura e sólidos totais varia entre 35 e 60%, o que pode classificá-lo como semi-gordo (25,0 - 44,9%) ou gordo (45,0 - 59,9%), de massa semi-cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45°C e 55°C), sendo permitido também a partir de massa crua (sem aquecimento) (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001a).

Devido a simplicidade da tecnologia utilizada na sua produção, o queijo de coalho possui grande valor comercial, alto rendimento e boa aceitação entre os consumidores (SENA et al., 2000). Sendo bastante popular na região Nordeste do Brasil (FAO, 2007), é encontrado principalmente nos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (FEITOSA et al., 2003; PERRY, 2004). Seu processamento e armazenamento são regulamentados pela Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001a).

O leite, principal matéria-prima na elaboração do queijo, deve apresentar características físico-químicas e microbiológicas ideais para que seja obtido um produto final de qualidade satisfatória (MALLET et al., 2012; CARLONI et al., 2015; PECKA-KIELB et al., 2016). Com o intuito de promover melhorias na qualidade dos produtos do setor lácteo brasileiro, foi criado a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, que trata da qualidade do leite cru, reunindo regulamentos técnicos que descrevem normas na produção, acondicionamento, requisitos de

qualidade físico-químicos e microbiológicos para leites tipos A, leites pasteurizados, cru refrigerado e equivalente, bem como normas para o sistema de transporte a granel (BRASIL, 2011).

Em relação à pasteurização ou tratamento térmico equivalente do leite utilizado como matéria-prima, bem como aos critérios macroscópicos e microbiológicos, o produto deve atender as determinações dos "Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos" - Portaria nº 146/96 – Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996).

A pasteurização, usada como estratégia para destruir os principais patógenos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009), também reduz as bactérias lácticas (BAL). Tal aspecto justifica a importância da utilização do fermento láctico comercial ou bactérias lácticas pertencentes à microbiota láctica natural do leite cru e de queijos artesanais regionais (MARINO; MAIFRENI; RONDININI, 2003). As BAL constituem um grupo bastante diversificado que tem como característica principal a capacidade de fermentar açúcares com produção de ácido láctico (GÁLVEZ et al., 2007). São amplamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota láctica endógena do leite (IRLINGER; MOUNIER, 2009; RESENDE et al., 2011), sendo bastante utilizadas na tecnologia de alimentos por contribuir no aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica em alimentos fermentados (SETTANNI; CORSETTI, 2008; FRANCIOSI et al., 2009).

O produto final deve apresentar textura compacta e macia, podendo se observar algumas olhaduras; a cor deve ser branco-amarelado uniforme; e o sabor deve ser brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado. Quanto ao odor, pode ser também ligeiramente ácido e similar ao de coalhada fresca, enquanto a casca geralmente se apresenta fina, sem rachaduras e pouco definida (BRASIL, 2001a). Quanto ao aspecto higiênico-sanitário, a Resolução RDC 12/2001 da ANVISA determina que o produto deva apresentar uma tolerância máxima de 500 Número Mais Provável (NMP)/g de coliformes termotolerantes, 500 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em 25 g do produto (BRASIL, 2001b).

Portanto, a legislação brasileira sobre queijo de coalho apresenta-se muito ampla, pouco definida e com várias lacunas, até mesmo quando estabelece critérios adicionais relacionados ao queijo de coalho artesanal elaborado a partir de cru, com período de maturação pouco definido (BRASIL, 2013).

2.2 PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO

A fabricação do queijo de coalho ainda não apresenta padronização do seu processo. Embora o produto já seja manufaturado em escala industrial, técnicas artesanais ainda são bastante utilizadas para a sua produção vindo a repercutir na falta de uniformidade do produto final (SILVA; MORENO; MORAES, 2010; SOUSA et al., 2014).

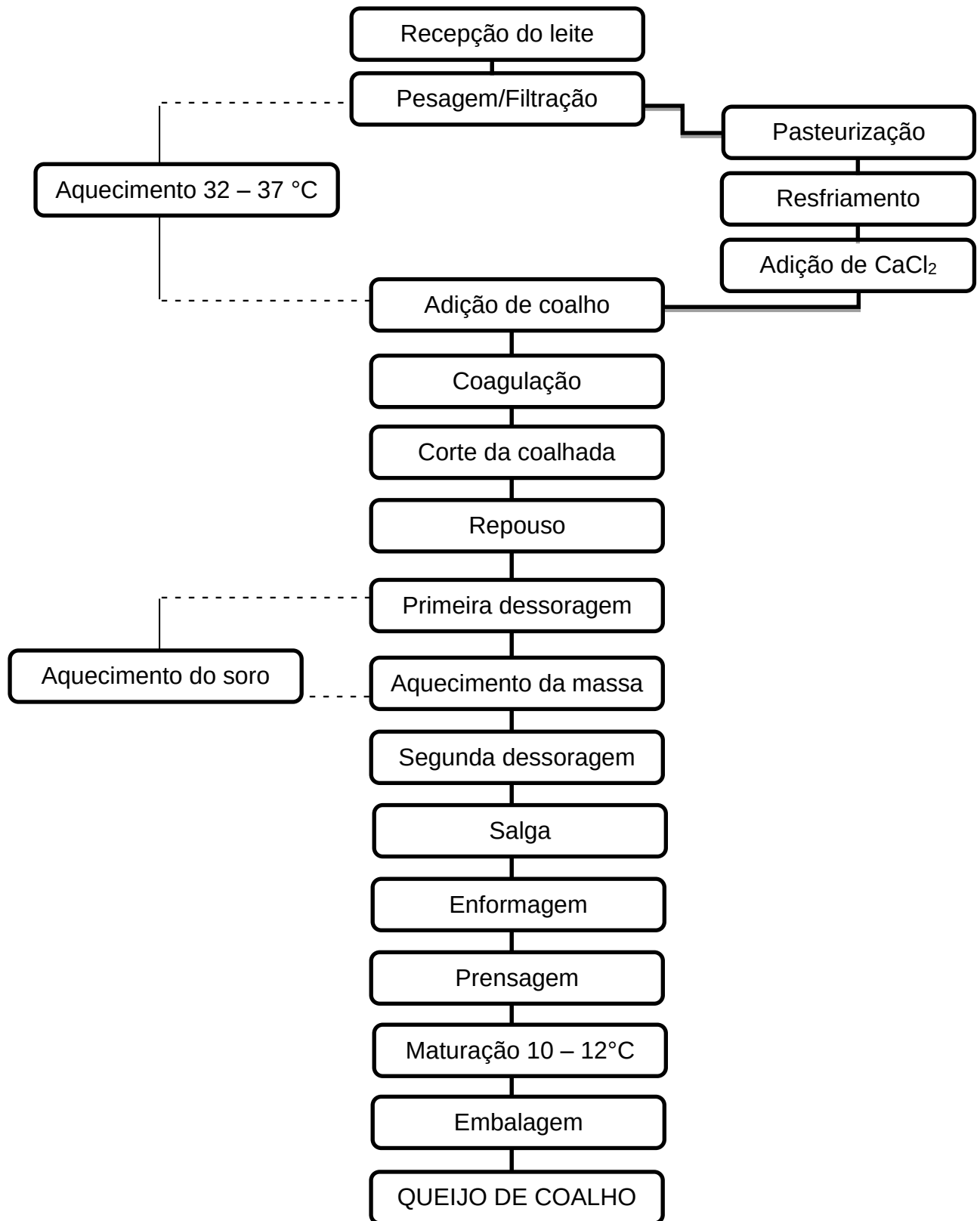
Vários estudos apontam que a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e o processo de maturação dos queijos são pré-requisitos para a obtenção de produtos que atendam aos critérios de identidade e qualidade previamente estabelecidos (TIMM et al., 2004; D'AMICO; DONNELLY, 2010; MALLET et al., 2012; MENDES et al., 2014; CARLONI; PETRUZELLI; AMAGLIANI, 2015; REIS et al., 2015; PECKA-KIELB et al., 2016). A falta destes critérios na produção do queijo de coalho permite que o produto seja elaborado com baixa qualidade, principalmente no aspecto higiênico-sanitário, dificultando sua comercialização (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; DANTAS et al., 2013).

As condições gerais ideais de processamento do queijo de coalho devem seguir as práticas de higiene dispostas no Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos - Portaria nº 368/1997 – Ministério da Saúde (BRASIL, 1997a), e assim atender as exigências relacionadas aos padrões microbiológicos previstos pela Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Ministério da Saúde) (BRASIL, 2001b).

Com o objetivo de ilustrar uma das técnicas de elaboração bastante utilizada na linha de produção do queijo de coalho, na Figura 1 é apresentado um fluxograma com as sequências seguidas em unidades de pequeno porte, representando o processamento artesanal, bem como as etapas desenvolvidas nas unidades de maior porte ou nível industrial.

A elaboração do queijo de coalho na indústria se inicia com a higienização do leite cru, que compreende as etapas de filtração e pasteurização, tendo à filtração a finalidade de remover parcialmente as sujeiras, e a pasteurização, a destruição dos micro-organismos patogênicos responsáveis por causar DTA.

Figura 1 - Fluxograma de processamento de queijo (linha contínua, em unidade de maior porte, linha tracejada, processamento artesanal).



A coagulação do leite se dá pela ação das BAL naturalmente presentes ou por adição do coalho dissolvido em água potável, sem cloro, conforme recomendação do fabricante (CAVALCANTE et al., 2007). As BAL facilitam a ação do coalho, auxiliam na expulsão do soro e colaboram com as características sensoriais do produto (FERREIRA, 2001).

Após o corte da coalhada, ocorre liberação do lactosoro, e, em seguida, é realizada a primeira dessoragem. Em seguida, é feito o aquecimento da massa através de água quente ou vapor indireto até a obtenção de massa semi-cozida (até 45 °C) ou cozida (entre 45 e 55 °C), ou aquecer o soro (85 °C), podendo ainda ser obtido a partir de massa crua (BRASIL, 2001a).

A segunda dessoragem vai retirar cerca de 95% do soro, seguida pela salga por meio do uso de sal refinado na massa. Para o queijo coalho comum utiliza-se a proporção de 0,8-1,0%, e para o queijo de coalho no espeto ou palito utiliza-se a proporção de 1,2%, calculada sobre o volume total do leite processado (CAVALCANTE et al., 2007).

A pré-prensagem é um procedimento opcional que facilita a obtenção de queijo com textura fechada, peso uniforme e pequenas olhaduras mecânicas, quando não ocorre essa etapa, a massa é enformada manualmente na fôrma com ajuda do dessorador (CAVALCANTE et al., 2007).

As etapas seguintes são de prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura de 10 – 12 °C, normalmente durante 10 dias, período mínimo destinado à maturação, até a expedição do produto (BRASIL, 2001a).

A maturação tem a finalidade de desenvolver sabor, textura e aroma típico devendo ocorrer em condições de temperatura e umidade relativa do ar (75 - 80%) controladas (CAVALCANTE et al., 2007).

Com relação à embalagem, pode ser a vácuo ou não, embora a embalagem a vácuo utilizando filmes pvc apropriados para alimentos demonstre ser mais eficaz na conservação de queijos (DE JESUS et al., 2016)

A mudança mais comum no processo de fabricação do queijo de coalho se refere ao intuito de elaborar um produto com baixa capacidade de derretimento, porém sem alterar de forma significativa as suas características gerais de sabor e odor (MAIA, 2013).

Conforme alguns estudos sobre elaboração do queijo de coalho (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006, CAVALCANTE et al., 2007; SILVA; MORENO; MORAES,

2010, MEDEIROS et al., 2016), existe a necessidade de um processo uniforme de sua elaboração, com uma tecnologia apropriada melhor estabelecida a fim de melhorar a qualidade do produto, diminuir o manuseio durante seu processo de fabricação, minimizando os riscos microbiológicos. Também ocorre a necessidade de adotar a cadeia fria ao longo do período de produção, estocagem, distribuição e comercialização, aumentando assim a segurança do alimento e sua vida de prateleira.

2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO DE COALHO

A diferenciação dos aspectos que influenciam a qualidade final de queijos envolve a determinação e conhecimento do conjunto de atributos, incluindo a caracterização da matéria-prima, dos procedimentos de fabricação e das alterações físico-químicas que ocorrem ao longo do processamento e armazenamento do produto (DIEZHANDINO et al., 2015).

Para caracterização de queijos, o pH é considerado um parâmetro importante devido a sua influência na textura, na atividade microbiana e na maturação (SOUSA et al., 2014). Os valores de pH em queijo não maturados são elevados (5,7 - 6,5), tornando-os mais vulneráveis a sobrevivência e multiplicação de bactérias contaminantes (MUNCK, 2004). A adição de culturas lácticas como fermentos durante o processamento de queijos não maturados tem sido utilizada também com o intuito de causar maior redução do pH destes produtos, e, conseqüentemente, do crescimento da população de micro-organismos indesejáveis (MUNCK, 2004).

Os valores de pH em queijos dependem também da qualidade da matéria prima. O pH do leite bovino recém-ordenhado apresenta valor de pH entre 6,4 - 6,8, e pode ser um indicador da sua qualidade sanitária. Quando ocorre mastite, dependendo da gravidade da infecção, o pH do leite ordenhado pode atingir até o valor de 7,5; e na presença de colostro pode ser reduzido para valores próximos de 6,0 (MIRANDA et al., 2016). Vários fatores também contribuem para a ocorrência do leite ácido, entre eles, as condições precárias de higiene durante e após a ordenha, uso de utensílios mal higienizados, falhas no sistema de refrigeração, transporte inadequado e tempo prolongado de estocagem (FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013). Benevides et al. (2001) observaram que queijos de coalho elaborados com leite pasteurizado apresentam valores de pH maiores do que os elaborados com

leite cru. Tal fato foi atribuído como resultado da ação das colônias de fermento láctico sobre a lactose, implicando ainda em alteração do sabor e textura do queijo.

O aumento da acidez está diretamente relacionado com o aumento da população de micro-organismos mesófilos, psicotróficos e BAL (JAY, 2005; IRLINGER; MOUNIER, 2009; TODOROV; FRANCO, 2010). Em queijos, essa acidez precisa ser controlada, pois quando em excesso, pode causar alterações nas características sensoriais do produto a ponto de descaracterizá-lo (MIRANDA et al., 2016).

Com relação ao teor de umidade em queijos, Freitas Filho et al. (2009) relataram a sua influência sobre a atividade de água (a_w) do produto e atividade metabólica de micro-organismos ao longo do período de maturação, com possíveis impactos na modificação do pH, textura, sabor e aroma. O atributo de maciez ou dureza depende do teor de umidade do queijo, de modo que quanto maior a umidade, maior a maciez (LITTLE et al., 2008). Quanto ao aspecto funcional e econômico, o teor de umidade auxilia no aumento do rendimento e influencia na qualidade do produto (LEE et al., 2014).

As variações no teor de umidade em queijos podem estar relacionadas ao processo de produção, à quantidade e ao tipo de salga e à pressão exercida no momento da prensagem, com o tempo de maturação (IDE; BENEDET, 2001) e qualidade da matéria-prima (NASSU et al., 2001). O alto teor de umidade do queijo de coalho, associado ao elevado pH, atrelado a várias etapas de manipulação realizadas durante o seu processo de elaboração oferecem condições propícias à contaminação, sobrevivência e multiplicação de diferentes micro-organismos patogênicos envolvidos em surtos de DTA (CÂMARA et al., 2002).

O tempo de conservação do queijo de coalho também pode ser correlacionado com seu teor de umidade (BENEVIDES et al., 2001; NEAVES; WILLIAMS, 2010), quanto mais desidratados se apresentarem, maior sua conservação, mesmo em condições adversas (BENEVIDES et al., 2001).

A definição do aroma em queijos ocorre por produção de compostos aromáticos durante sua formação (HANNON et al., 2003; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005) por meio da lenta conversão de componentes químicos e bioquímicos presentes no leite como resultado da atividade microbiana (FUQUAY; FOX; MCSWEENEY, 2011). No entanto, também pode ocorrer formação de compostos nitrogenados indesejados, tais como as aminas biogênicas, que afetam

negativamente as características sensoriais do produto e pode conduzir a problemas de saúde no consumidor (FLICK; GRANATA, 2005).

Na abrangência das características físico-químicas do queijo de coalho, alguns estudos observaram variações em diversos parâmetros avaliados, as quais foram atribuídas à ausência de uniformidade no processo de elaboração (FREITAS FILHO et al., 2009; SILVA; MORENO; MORAES, 2010; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013; MEDEIROS et al., 2016).

2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS EM QUEIJOS E PARTICULARIDADES RELACIONADAS AO QUEIJO DE COALHO

A segurança microbiológica de alimentos é problema de interesse mundial, principalmente, em relação à proteção da saúde e bem-estar do consumidor (WHO, 2015e; SILK; MAHON, 2015). Em queijos, o aspecto microbiológico é considerado diverso, e seu estudo geralmente requer um conhecimento não apenas da composição do produto, mas também das condições de produção, maturação e armazenamento específico (NEAVES; WILLIAMS, 2010).

Por isso, acredita-se, geralmente, que o estabelecimento das características específicas finais em queijos relaciona-se de forma estreita com as práticas empregadas no processo de fabricação, embalagem, manipulação e diversidade da microbiota do produto (ROBINSON; WILBEY, 2002; ERCOLINI et al., 2004; SULLIVAN et al., 2013), à tecnologia utilizada e a qualidade da matéria prima (IRLINGER; MOUNIER, 2009; CARLONI; PETRUZELLI; AMAGLIANI, 2015; PECKAKIELB et al., 2016). Consequentemente, diferentes tipos de queijo apresentam distintos níveis de risco microbiológico (ROBINSON, 2005; NACMCF et al., 2010; ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015a), em virtude dos agentes patogênicos serem mais propensos a sobreviver ou crescer em queijos moles do que nas variedades mais duras (NEAVES; WILLIAMS, 2010; ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2015b).

O aspecto microbiológico do leite constitui um dos principais problemas no processo de produção de queijos. Em geral, a qualidade do leite cru no Brasil é ainda considerada insatisfatória por apresentar contagens elevadas de micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e coliformes (SANTANA; BELOTI; BARROS, 2001; MENEZES et al., 2015). Este aspecto indica o uso de leite pasteurizado na fabricação de queijos frescos ou de baixa-maturação, como

estratégia inicial de garantia da segurança destes produtos (CAVALCANTE et al., 2007; GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

A maturação de queijos envolve uma ampla série de processos de natureza microbiológica, bioquímica e física, muito variável entre os queijos duros, semiduros e macios (REHMAN et al., 2000; FOX et al., 2004). Quanto aos processos microbiológicos, os diferentes tipos de BAL observadas em queijos de coalho (CARVALHO, 2007) exercem participação importante no desenvolvimento das características físico-químicas como sabor, aroma e textura (GRAPPIN; BEUVIER, 1997; HASSAN; FRANK, 2001) e no controle microbiológico (CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2001; PARADA et al., 2007; BAYLIS, 2009; MONTEL et al., 2014), por apresentarem capacidade de restringir a proliferação de microrganismos indesejáveis, seja por competição ou produção de agentes antimicrobianos, como bacteriocinas (CHEN; HOOVER, 2003), ácidos orgânicos (CHAILLOU et al., 2005) e hipotiocianato (JONES et al., 2008).

A contagem inicial da população microbiana total em queijos varia em média de $1,0$ a $2,0 \times 10^9$ UFC/g (ROBINSON; WILBEY; AL-OTAIBI, 2002; IRLINGER; MOUNIER, 2009). Em estudos realizados com queijo de coalho, foram encontradas contagens bacterianas que variaram de 7,32 a 9,47 log UFC/g para micro-organismos aeróbios mesófilos e, de 6,38 a 9,36 log UFC/g para BAL (QUEIROGA et al., 2009; MACHADO et al., 2011). Entre as BAL, algumas espécies participam no processo de fermentação e são chamadas de BAL iniciadoras ou “starters”, enquanto outras são envolvidas na maturação do queijo e denominadas BAL não iniciadoras ou secundárias (BERESFORD et al., 2001; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Em seguida, é observado, geralmente, um declínio da população microbiana iniciadora em decorrência da insuficiência de oxigênio, aumento da acidez e da presença de compostos inibidores produzidos durante o processo de maturação, ao passo que se inicia um aumento da população de BAL não iniciadora (ROBINSON; WILBEY; AL-OTAIBI, 2002; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Os diferentes grupos de micro-organismos se mantêm em equilíbrio, mantendo aproximadamente essas contagens ao longo do período de maturação (IRLINGER; MOUNIER, 2009).

Como características gerais, as BAL se apresentam como micro-organismos gram-positivos, com morfologia variável de cocos ou bacilos, catalase negativa, não formadoras de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou

estritamente anaeróbicas (HASSAN; FRANK, 2001; SALMINEN; VON WRIGHT, 2004), compreendendo um total de 16 gêneros (JAY, 2005).

Os gêneros de BAL mais comum encontrados em queijos são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000). Essas bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados e possuem ação probiótica e antimicrobiana (PINTO et al., 2006; NERO et al., 2009; MORAES et al., 2010). No Brasil, o gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL isoladas de amostras de queijo de coalho artesanais produzido no Ceará (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007), assim como entre aquelas isoladas do mesmo tipo de queijo produzido no Rio Grande do Norte (BRUNO et al., 2007; BRUNO; CARVALHO, 2009). Até mesmo em estudo que não observou o gênero *Enterococcus* como predominante absoluto, ainda assim, a espécie *Enterococcus faecium* (26,9%), foi a que mais prevaleceu (MEDEIROS et al., 2016).

Além das BAL, como microbiota normal, a detecção de patógenos em queijos de coalho também tem sido frequente. A presença desses micro-organismos em alimentos, e o elevado índice de contaminação bacteriana nesses produtos, estão relacionados com processos inadequados de fabricação, instalações e práticas de manipulação que não atendem aos padrões higiênico-sanitários estabelecidos, má qualidade da matéria-prima, armazenamento e transporte inadequados da matéria-prima e/ou do produto final (NASSU et al., 2000; BASTOS et al., 2001; BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; BORGES, 2006; BORGES et al 2008; OLIVEIRA et al., 2010; SERRAINO et al., 2012; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013; SOUSA et al., 2014; MEDEIROS, 2016).

Os ambientes de processamentos de alimentos são fatores relevantes associados a frequentes contaminações microbianas, principalmente pelo fato de várias bactérias, incluindo *L. monocytogenes* e *S. aureus*, apresentarem a capacidade de aderir em equipamentos e superfícies de contato de alimentos e formar biofilmes (VAN HOUTT; MICHIELS, 2010) como estratégia de sobrevivência (COSTERTON et al., 1995). Além de atuar como fontes de contaminações persistentes (SAUDERS; D'AMICO, 2016), os biofilmes conferem maior resistência microbiana aos germicidas usuais, quando comparado as suas respectivas células planctônicas, devido à sua fisiologia particular e barreiras físicas constituídas (STEWART, 2002; RAMPELOTTO et al., 2016), acarretando implicações

substanciais nas indústrias alimentícias e necessidade de intervenções específicas para seu controle. (YANG et al., 2012).

A contaminação cruzada por meio de equipamentos e do ambiente de processamento de alimentos tem sido implicada como a principal causa de transmissão de *L. monocytogenes* (STESSL et al., 2014), principalmente em queijos elaborados com leite pasteurizado (SAUDERS; D'AMICO, 2016).

A não aplicação de boas práticas de fabricação (BPF) no ambiente de produção de queijo de coalho consiste em uma problemática séria por se tratar de produto altamente manipulado, e por sua matriz constituir substrato favorável a presença de microrganismos indicadores e contaminação por bactérias patogênicas (RUWER; MOURA; GONÇALVES, 2011).

Para avaliar e monitorar a segurança dos processamentos e contaminações pós-processos em queijos, normalmente, é realizado a pesquisa de micro-organismos indicadores, procedimento que serve para estimar o nível de contaminação e o tempo de vida útil do produto (CHO et al., 2016). Os riscos à saúde pública estão relacionados com a presença de micro-organismos que são patogênicos para os seres humanos, com características ecologicamente semelhantes aos indicadores, pois compartilham as mesmas condições de crescimento (FORSYTHE, 2013; FRANCO; LANDGRAF, 2008; MENDONÇA; LEHFELD, 2015; CHO et al., 2016). Geralmente, esses micro-organismos indicadores não são detectados em queijos onde o leite foi submetido a tratamento térmico, embora baixas contagens ocorram após um período de maturação entre 2 e 15 dias, fato este, associado a contaminação durante a elaboração, devido as manipulações (DIEZHANDINO et al., 2015; REIS; SANTANA; ROIG, 2015; SANDES et al., 2016).

No Quadro 1 são citados estudos e respectivos micro-organismos patogênicos ou grupo de micro-organismos identificados como contaminantes em amostras de queijo de coalho. Os principais indicadores de contaminação presentes neste tipo de queijo incluem micro-organismos do grupo dos coliformes, bactérias como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e ainda, fungos filamentosos e leveduras (NICOLAU et al., 2001; FEITOSA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2007; SILVA; MORENO; MORAES, 2010; SOUSA et al., 2014).

Quadro 1 – Estudos com ênfase na identificação de micro-organismos patogênicos isolados ou grupos como contaminantes em amostras de queijo de coalho.

Micro-organismo ou grupo de micro-organismo	Referência
Bolores e leveduras, coliformes termotolerantes, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.	Borges et al., 2003
<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., coliformes termotolerantes.	Duarte et al., 2005
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.	Borges et al., 2008
Bolores e leveduras, coliformes termotolerantes, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp.	Feitosa et al., 2003
<i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e coliformes termotolerantes.	Santana et al., 2008
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras.	Alves et al., 2009 Leite Júnior, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp.	Yamaguchi et al., 2013
<i>Listeria monocytogenes</i> .	Branco et al., 2003 Sousa et al., 2006 Barancelli et al., 2011 Barancelli et al., 2014
<i>Salmonella</i> spp. e coliformes termotolerantes.	Dantas et al., 2013 Medeiros, 2016
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, coliformes termotolerantes.	Freitas; Travassos; Maciel, 2013 Adami et al., 2015
<i>E. coli</i> entero-toxigênica.	Silva et al., 2014
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, coliformes termotolerantes e <i>Salmonella</i> spp.	Oliveira et al., 2010 Meneses et al., 2012 Sousa et al., 2014
Coliformes termotolerantes.	Leite et al., 2002 Dias et al., 2015
Coliformes termotolerantes, <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp. e <i>Bacillus cereus</i> .	Sousa Júnior et al., 2015
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Escherichia coli</i> .	Silva; Moreno; Moraes, 2010 Evangelista-Barreto et al., 2016

As bactérias Gram-negativas são citadas como os micro-organismos psicrótróficos de maior incidência em leite cru refrigerado e em produtos derivados, sendo os gêneros mais frequentes: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Yersinia* (SANTOS; CARVALHO; ABREU, 1999; BOEKEL et al., 2001; NÖRNBERG et al., 2010). Bactérias Gram-positivas podem ser encontradas no leite

cru refrigerando e em produtos derivados, de modo que os gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* são os mais comumente detectados (NÖRNBERG et al., 2010). São considerados como micro-organismos indicadores de condições higiênico-sanitárias: coliformes totais e termotolerantes, enterococos, enterobactérias, bolores e leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Estes fatos reforçam a necessidade de obstáculos como a cadeia de frio e monitoramento dos processos em toda a cadeia de produção, distribuição e armazenamento de alimentos serem utilizados como estratégia para garantia da qualidade microbiológica de alimentos, inclusive de queijo de coalho, por serem classificados como alimentos potencialmente capazes de abrigar micro-organismos patogênicos, devido suas condições favoráveis de pH e a_a (NACMCF, 2010; FDA, 2016). Tais medidas podem limitar o crescimento de vários patógenos, inclusive de *L. monocytogenes* e *S. aureus* (NACMCF, 2010; RAKHMAWATI; NYSEN; AERTS, 2014), prevenindo infecções e intoxicações.

2.5 *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* COMO PATÓGENOS ALIMENTARES

2.5.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, em forma de bacilos, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa e reconhecida como o agente etiológico da listeriose (SUH et al., 2014; ALLERBERGER et al., 2015), infecção de origem alimentar grave (D'ORAZIO, 2014; NYARKO; DONNELLY, 2015) que mostra tendência de ocorrência crescente nos últimos anos em vários países (EFSA, 2015a).

Atualmente 15 espécies formam o gênero *Listeria* (DEN BAKKER et al., 2014), e apenas duas são consideradas patogênicas, a saber: *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* (SUH et al., 2014). Cerca de 95% das infecções em humanos já relatadas foram causadas por *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (FRETZ et al., 2010; SILK; MAHON, 2015).

A listeriose é uma doença caracterizada como de severa gravidade em decorrência da elevada taxa de mortalidade (20 – 30%) (CHAN; WIEDMANN, 2009; NYARKO; DONNELLY, 2015). Seu agente etiológico é considerado um dos patógenos emergentes de origem alimentar mais importante e particularmente bem sucedido em causar DTA, devido a sua resistência a diversas condições ambientais, como baixos valores de pH, altas concentrações de sal, e ao contrário de muitos patógenos, apresenta a capacidade de sobreviver e se multiplicar lentamente a baixas temperaturas. Esta característica permite o seu crescimento mesmo em alimentos adequadamente refrigerados (2 – 4 °C) (LE MONNIER; LECLERCQ, 2009; SILK; MAHON, 2015; TU et al., 2016).

Crianças, recém-nascidos, mulheres grávidas, idosos e pacientes imunocomprometidos são os grupos mais vulneráveis a listeriose (ALLERBERGER; WAGNER, 2010; COSSU et al., 2016). Suas manifestações clínicas variam de um leve quadro de diarreia a meningite, septicemia, meningoencefalite e endocardite. O sistema nervoso central é o órgão frequentemente afetado pela infecção (RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2013; PIETRO et al., 2015).

A gravidade da listeriose depende de vários fatores, incluindo a virulência da estirpe infectante e a susceptibilidade do hospedeiro. Pode ocorrer de forma assintomática em indivíduos saudáveis, enquanto grupos de alto risco podem desenvolver quadros graves da infecção (CAMEJO et al., 2011; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2013). A disseminação hematogênica do micro-organismo nestes indivíduos pode conduzir a manifestações graves, e pelo fato da bactéria poder atravessar a placenta pode também provocar o aborto do feto em mulheres grávidas ou a ocorrência de natimorto (ALONZO et al., 2011; CAMEJO et al., 2011; CDC, 2013; IMANISHI et al., 2015; NYARKO; DONNELLY, 2015).

Por ser um patógeno de origem alimentar, *L. monocytogenes* é frequentemente detectada no ambiente agrícola e pode persistir por longos períodos no solo, água, alimentos e fezes, proporcionando um reservatório de contaminação na cadeia alimentar e na água (FOX et al., 2009). Sua capacidade de formar biofilmes em superfícies de contato nos ambientes de processamentos de alimentos (ALLERBERGER; WAGNER, 2010; BONSAGLIA et al., 2014) pode facilitar a persistência, a difusão e a contaminação de alimentos em várias fases da produção (ALLERBERGER et al., 2015; GUILBAUD et al., 2015).

Apesar de *L. monocytogenes* ser um contaminante ambiental amplamente distribuído, sua incidência varia entre países, muitas vezes apresenta período de incubação prolongado e com manifestações clínicas muito distintas, o que dificulta o diagnóstico e eleva a letalidade da doença (QUERO et al., 2014). Análises realizadas em vários focos descobriram que os sintomas gastrointestinais apareceram dentro de 24 h após a ingestão do alimento contaminado, e bacteremias ocorreram dentro de dois dias. Porém, a média foi de nove dias para o surgimento dos sintomas do Sistema Nervoso Central (SNC), e por muito mais tempo (17-67 dias) para os casos associados à gravidez (GOULET et al., 2013).

Dados epidemiológicos indicam que os alimentos envolvidos em surtos de listeriose apresentam contaminação superior a 100 UFC/g (FAO/WHO, 2004), contudo, a determinação da dose infecciosa tem sido difícil. Recentes modelos de avaliação de riscos tem permitido a preparação de curvas de dose-resposta que indicam que a probabilidade de infecção varia consideravelmente, dependendo da dose e estirpe ingerida e, sobretudo, da sensibilidade do hospedeiro (SILK; MAHON, 2015).

A incidência estimada da listeriose em Portugal foi de 1,4 e 2,3 casos por milhão de habitantes em 2003 e 2007, respectivamente, com uma taxa de mortalidade entre 17% - 37,5% (ALMEIDA et al., 2010). Em análise de dados de surtos de origem alimentar relatados internacionalmente entre 1988 e 2007, 337 casos, entre um total de 4093, foram associados a produtos lácteos, e 6,6% destes foram atribuídos a *L. monocytogenes* (GREIG; RAVEL, 2009). Em média, a incidência anual de listeriose nos Estados Unidos foi de quase 0,3 casos/100.000 indivíduos entre 2009 a 2011 (CDC, 2013). Os queijos foram apontados como o principal alimento envolvido em surtos de listeriose relatados em todo o mundo (WARRINER; NAMVAR, 2009; KOCH et al., 2010; YDE et al., 2012). Atualmente, os queijos dividem a segunda posição com peixes (12%), perdendo apenas para carnes (13%) (CDC, 2013; ROBERTSON et al., 2016).

Na União Europeia no período de 2010 a 2012 foram registrados 1.640 casos somente de listeriose, com índice de mortalidade de 17,8% (RAKHMAWATI; NYSEN; AERTS, 2013). Em 2014, o número de casos subiu para 2161, ocasionando 210 (15%) mortes, a maior taxa já registrada (EFSA, 2015a).

No Brasil, 58,5% dos casos de DTA não tiveram seus agentes etiológicos definidos, no período de 2000 a 2015 (BRASIL, 2015), subentende-se que a listeriose foi subdiagnosticada e subnotificada.

Nos Estados Unidos, no período de 2010 a 2015, foram registrados 377 casos de listeriose, com 73 (19,4%) óbitos, sendo 108 destes casos, provenientes de queijos contaminados (CDC, 2016).

Estudos demonstraram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de queijo feitos a partir de leite cru ou pasteurizado (SHRESTHA et al., 2011; ROSSHAUG et al., 2012). A capacidade de sobreviver e se multiplicar em condições ambientais reconhecidas como hostis, para a maioria dos outros patógenos, permitem que *L. monocytogenes* supere as barreiras impostas pelas tecnologias de preservação de alimentos, representando um risco potencial para a saúde do consumidor (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; GANDHI; CHIKIDAS, 2007; WALECKA-ZACHARSKA et al., 2012; CHEN et al., 2014).

L. monocytogenes tem sido indicada como um dos principais agentes patogênicos associados a produtos lácteos, especialmente os produtos derivados de leite não pasteurizado, não só por parte da Comissão Europeia para Segurança de Alimentos (EFSA 2012; EFSA, 2015a), mas também pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2015) e *Food Standards Australia New Zealand* (OZFOODNET, 2010; OZFOODNET, 2012; FSANZ, 2014). Produtos lácteos, como os queijos, são uma rota bem reconhecida para a transmissão de *L. monocytogenes* nos seres humanos (FSANZ, 2013; RAKHMAWATI; NYSEN; AERTS, 2013; HAMADI et al., 2014; RAKHMAWATI; NYSEN; AERTS, 2014; SILK; MAHON, 2015).

No leite refrigerado, *L. monocytogenes* pode se multiplicar e atingir populações com potencial de causar listeriose. Este aumento populacional também pode ocorrer em queijos, principalmente naqueles que apresentam média a alta umidade (COGAN et al., 2011; BERNINI et al., 2013). A sobrevivência e crescimento desta bactéria em produtos lácteos dependem das condições de produção, maturação e armazenamento (ALMEIDA et al., 2013). Em queijos duros, a presença de *L. monocytogenes* pode ocorrer em decorrência da contaminação durante o preparo, embalagem e distribuição (SCHAFFNER et al., 2003; GUILBAUD et al., 2015).

Leite e produtos lácteos foram responsáveis por cerca de 50% dos surtos de listeriose na Europa com formas clínicas graves, desempenhando, assim, um papel

epidemiológico preocupante (SCHLECH, 2000; DE BUYSER; DUFOUR; MAIRE; LAFARGE, 2001). Alguns regulamentos voltados para a segurança de alimentos na União Europeia (EC 2005; EC 2007) têm estabelecido critérios para a prevenção da contaminação e sobrevivência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos. No entanto, devido às habilidades específicas deste patógeno, seu controle continua sendo um grande desafio.

Prevenir listeriose exige muitas medidas que são idênticas àquelas para evitar outras DTA. Portanto, o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, a implantação efetiva do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a vigilância da bactéria no ambiente de processamento de queijos, são medidas reconhecidamente importantes para garantir a segurança alimentar apoiando medidas de preparo e armazenamento adequados, de modo a fornecer produtos seguros ao consumidor (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015). Entretanto, exista ainda, a necessidade de desenvolver e validar métodos quantitativos suficientes para detectar o patógeno em baixos níveis (0 a 100 UFC/g) em diversas matrizes alimentares, e, assim, apoiar os modelos de avaliação de risco por meio de estudos desafio.

2.5.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulados, mesófilos, com capacidade de produzir enterotoxinas (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). São capazes de crescer numa grande faixa de temperaturas que vai de 6 a 48,5 °C com um valor ótimo entre 35 a 41 °C; em pH de 4 a 10, com um ótimo de 6 a 7, em concentrações de cloreto de sódio de até 20% e ainda se mantém viável em baixa a_a (0,83 – 0,86) (RODRIGUEZ-CATURLA et al., 2012). Estas características favorecem o crescimento do micro-organismo em muitos produtos alimentícios como carne, frango, leite e queijos (JORGENSEN et al., 2005; COLOMBARI et al., 2007; FDA, 2010; HAMADI et al., 2014).

S. aureus é um importante agente patogênico devido a uma combinação de virulência mediada por toxinas, capacidade de invasão e resistência a antibióticos (FLEUROT et al., 2014). Além das enterotoxinas termoestáveis, *S. aureus* produz outras diferentes exotoxinas, tais como a toxina esfoliativa A e B (ETA e ETB) e a

toxina-1 da síndrome do choque tóxico da toxina-1 (TSST-1) que estão implicadas na patogênese de diferentes condições patológicas (DINGES et al., 2000).

Este micro-organismo é considerado como sendo um dos patógenos alimentares mais importantes, de modo que a intoxicação alimentar estafilocócica se apresenta entre as DTA mais frequentes em todo o mundo (HENNEKINNE et al., 2012; LOPEZ-VALLADARES et al., 2014; ZELENY et al., 2015; AKINDOLIRE; KUMAR; ATEBA, 2015). *S. aureus* produz enterotoxinas extracelulares termoestáveis que são pré-formadas nos alimentos, principalmente, nas fases de crescimento exponencial e estacionária. A progressão dos sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica, bem como o restabelecimento à normalidade do estado geral de saúde, é relativamente rápida na maioria dos indivíduos acometidos (ARAGON-ALEGRO et al., 2007). Em decorrência dessa rapidez na recuperação dos indivíduos acometidos, a maioria dos casos de intoxicação estafilocócica são subnotificados (PINTO; CHENOLL; AZNAR, 2005).

Os sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica incluem cólicas abdominais, náuseas, vômitos, por vezes, seguidos de diarreia (MURRAY, 2005; ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Geralmente, eles se iniciam de 30 minutos a oito horas, após a ingestão do alimento contaminado. No entanto, o período de incubação varia de acordo com a quantidade de enterotoxinas ingeridas (MURRAY, 2005). Porém, a quantidade de enterotoxina necessária para desencadear os sintomas é muito pequena (0,5 µg/mL) (MURRAY, 2005), embora 100 – 200 ng/mL de enterotoxina clássica A, já sejam suficientes para intoxicar crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Contagens de *S. aureus* em torno de 5 log UFC/g, são citadas como suficientes, para a produção de enterotoxinas em quantidade necessária para o desenvolvimento dos sintomas da intoxicação estafilocócica (ALOMAR et al., 2008).

S. aureus já foi referido como a terceira causa mais comum de intoxicação alimentar no mundo (ACCO et al., 2003), a segunda mais importante no Reino Unido (WIENEKE; ROBERTS; GILBERT, 1993), e o segundo mais importante agente patogênico envolvido em surtos de DTA no Brasil (BRUST et al., 2013; BRASIL, 2015). A bactéria também é reconhecida como o agente etiológico mais comum de intoxicação alimentar associada ao consumo de queijo, principalmente aqueles produzidos a partir de leite cru (DE BUYSER et al., 2001). Em 2013, foi o maior causador de DTA na União Europeia, sendo os queijos o segundo grupo de

alimentos mais referido (6,4%), sendo precedido apenas pelos alimentos mistos (19,1%) (EFSA, 2015b).

Na China, estima-se que, aproximadamente, 20-25% dos casos de DTAs provenientes de bactérias são atribuídas ao *S. aureus* (LI et al., 2015), com vários surtos relatados (LIU et al., 2006; WANG et al., 2012; YAN et al., 2012; LI et al., 2015). Outros relatos também ocorreram na Itália (GALLINA et al., 2013), na Coreia do Sul (CHA et al., 2006; HYEON et al., 2013) e no Japão (SATO'O et al., 2014; SUZUKI et al., 2014).

Apesar de alguns autores relatarem que outras espécies de estafilococos coagulase-positiva, como *S. intermedius* e *S. hyicus*, podem ser enterotoxigênicas (VERNOZY-ROZAND et al., 1996), *S. aureus* é a espécie mais predominante envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Aproximadamente um terço das estirpes produzem enterotoxinas causadoras da intoxicação alimentar (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989; HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012). Os últimos estudos citam vinte e três enterotoxinas estafilocócicas identificadas sorologicamente (PERILLO et al., 2012), e a maioria delas, se mostraram capazes de induzir emese em animais (OMOE et al., 2013). No entanto, as enterotoxinas estafilocócicas clássicas A, B, C, D e E, são responsáveis pela ocorrência de 95% dos casos desta intoxicação, embora as enterotoxinas A e C sejam as mais comumente envolvidas (AL-TARAZI et al., 2009).

A contaminação do leite cru e produtos lácteos por *S. aureus* pode ocorrer em diferentes fases da cadeia de produção de alimentos, de modo que nas atividades agrícolas as principais fontes de contaminação do leite cru são a pele de animais, superfícies dos ambientes, mucosas, equipamentos de ordenha e mãos dos ordenhadores (BERGONIER et al., 2003). A contaminação na fabricação de queijos se dá principalmente por meio dos manipuladores envolvidos no processo de fabricação, das superfícies de contato do ambiente e do leite contaminado e mantido durante armazenamento em temperaturas abusivas (DO CARMO et al., 2002; CHARLIER et al., 2009; CARRASCOSA et al., 2016).

Nos últimos anos, o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana em estirpes de *S. aureus*, nas dimensões hospitalar e comunitária, tornou-se um preocupante problema de saúde pública (DELEO et al., 2010; ORTEGA et al., 2010; GRAVELAND et al., 2011). De forma concomitante, tem ocorrido um aumento da detecção de cepas de *S. aureus* resistentes em alimentos e

do número de surtos de intoxicação alimentar relacionado à produção de enterotoxinas por parte de cepas de *S. aureus* resistentes (CHAO et al., 2007; SAUER et al., 2008; HUANG et al., 2009; LIN et al., 2009; AYDIN; SUDAGIDAN; MURATOGLU, 2011; PU et al., 2011; WANG et al., 2011; WANG et al., 2012.; HE et al., 2013; WANG et al., 2014).

Há relatos de que o nível máximo de contaminação por *S. aureus* em queijos se dá nas primeiras horas após a produção (JAKOBSEN et al., 2011), o que caracteriza, portanto, os queijos frescos como capazes de oferecer maior potencial de risco para intoxicação estafilocócica, quando comparados aos queijos maturados. Intoxicações por *S. aureus* relacionadas com consumo de queijo contaminado provocam impactos tanto para a qualidade do produto quanto para a saúde pública (TEMELLI et al., 2006, MORANDI et al., 2007). Informações da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) indicam que refeições mistas com queijos foram a principal causa de intoxicação alimentar causada por toxinas estafilocócicas (SCHELIN et al., 2011). Apesar da adoção de pasteurização do leite, da fermentação e do processo de maturação consistir em ferramentas úteis para retardar o crescimento de *S. aureus* em queijos, torna-se primordial realizar o controle do patógeno também por meio da quantificação da sua população no alimento (AKINEDEN et al., 2008; SILVA, 2012; ÁVILA et al., 2016).

A identificação dos micro-organismos envolvidos como agentes etiológicos de DTA continua a ser limitado (WHO, 2015c; WHO, 2015d), sendo que 50 - 60% de todos os agentes causadores de surtos de DTA não são identificados (TOMPKINS et al., 1999; BRASIL, 2015). Torna-se importante salientar que DTA causadas por bactérias produtora de toxinas são quase sempre subestimadas devido à falta de ferramentas para diagnóstico (NEWELL et al., 2010). Assim, apesar de todos os esforços de pesquisadores, governos e indústria, as DTA têm continuado como um importante problema de saúde pública em todo o mundo, com enormes implicações tanto para o bem-estar social das populações e para as economias das nações (WHO, 2015a).

O principal fator determinante da necessidade de realização ou não, de estudos desafios em um alimento ou grupo de alimentos, em particular, são os valores de pH e a_a . Considerando que o queijo de coalho apresenta elevados valores de pH e a_a , os quais sugerem a sua atuação como substrato favorável para bactérias patogênicas, incluindo *L. monocytogenes* e *S. aureus*, ocorre a

necessidade de realização de estudos desafio com a finalidade de diminuir os possíveis riscos aos consumidores.

Os estudos desafio, incluindo patógenos específicos, são utilizados para avaliar o comportamento microbiano (sobrevivência e crescimento) em alimentos mantidos sob condições pré-estabelecidas, de modo que os seus resultados servem para apoiar possíveis mudanças na forma como o produto é manuseado ou armazenado, com o intuito de aumentar a vida de prateleira e diminuir o risco de envolvimento em surtos de DTA (IFT, 2000). Os resultados derivados deste tipo de estudo, podem ser utilizados para avaliar a inibição ou inativação de agentes patogênicos, antes da introdução de um produto no comércio, ou mesmo servir de base, para modificações nos protocolos de produção, armazenamento e distribuição de um produto já comercializado (IFT, 2000).

Considerando o amplo consumo de queijo de coalho na região Nordeste do Brasil, e os resultados de estudos que mostram níveis de contaminação por agentes patogênicos, que refletem possível risco a saúde dos consumidores, torna-se necessária à realização de testes desafio, com a finalidade de obtenção de dados que revelem a capacidade de diferentes patógenos em sobreviver, multiplicar e persistir no produto ao longo do armazenamento. Em virtude da reconhecida patogenicidade de *L. monocytogenes* e de *S. aureus*, e de relatos na literatura que demonstram a contaminação de queijo de coalho por estas bactérias, justifica-se a necessidade da realização de estudos que avaliem o seu comportamento neste produto, de forma a poder subsidiar o estabelecimento de medidas que venham a diminuir o potencial risco aos consumidores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DAS ANÁLISES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba.

3.2 AMOSTRAS DE QUEIJO DE COALHO

As amostras de queijo de coalho foram adquiridas de supermercados da cidade de João Pessoa - Paraíba. Todas as amostras possuíam Selo de Inspeção Federal (SIF) ou Selo de Inspeção Estadual (SIE) no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Foram selecionadas duas marcas de queijos para experimentos distintos. De cada marca foram adquiridas dez amostras do mesmo lote que pesavam em média 3,3 kg, sempre estando nos primeiros 10% (dias) do seu período de prateleira. Ainda, no local de venda as amostras foram avaliadas quanto à ausência de sinais visíveis de alterações e violação da embalagem. O transporte das amostras foi realizado em caixas térmicas contendo gelo e analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos acima referido, no tempo máximo de 4 h, por um período máximo de 30 minutos. Antes do processamento, as amostras foram verificadas quanto a ausência de limosidade superficial e *off-flavor*.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE QUEIJO

As amostras de queijo foram analisadas em relação aos seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, gordura na matéria seca, teor de sal (cloretos), a_a , pH e acidez titulável em ácido láctico. A parte mais externa de cada amostra de queijo foi removida e a amostra dividida em porções de 25 g. O material foi macerado assepticamente, homogeneizado e analisado em relação aos parâmetros físico-químicos acima mencionados seguindo procedimentos descritos pela AOAC (2012).

3.4 REATIVAÇÕES DAS CEPAS BACTERIANAS TESTE E ADAPTAÇÃO AOS ANTIBIÓTICOS

Duas cepas de *L. monocytogenes* (ATCC 7644, ATCC 19115) e duas de *S. aureus* (ATCC 19095, ATCC 13565) foram utilizadas como cepas teste. Todas as cepas foram gentilmente cedidas pela Coleção de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). As cepas *S. aureus* ATCC 19095 e ATCC 13565 foram isoladas de materiais clínicos, enquanto as cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 19115 foram isoladas de materiais não clínicos, porém todas têm sido amplamente utilizadas em estudos científicos. As cepas foram fornecidas na forma liofilizada, sendo reativadas em Caldo Muller-Hinton (CMH) (Himedia, Mumbai, Índia), e incubadas a 30 e 37 °C para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente, utilizando dois cultivos de 24 horas consecutivos. As culturas estoque foram mantidas em criotubos contendo CMH suplementado com glicerol (15 g/100 mL) a – 20 °C.

As cepas foram adaptadas ao cultivo na presença de antibióticos como forma de enumerá-las seletivamente na presença da microflora autóctone presente nas amostras de queijo de coalho por meio do plaqueamento em ágar suplementado com o mesmo antibiótico utilizado no procedimento de adaptação (SAMELIS et al., 2003; LEKKAS et al., 2006). As cepas resistentes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (LM-ATCC 7644NA+) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (LM-ATCC 19115NA+) foram obtidas por meio de exposições consecutivas (24 horas) a concentrações crescentes de ácido nalidíxico em caldo CMH (30 °C), de modo que as cepas se tornassem resistentes a 50 µg/mL do antibiótico.

As cepas resistentes de *S. aureus* ATCC 19095 à rifampicina (SA-ATCC 19095Rif+) e *S. aureus* ATCC 13565 (SA-ATCC 13565Str+) resistentes a estreptomicina foram obtidas por meio de exposições consecutivas (24 horas) em CMH (37 °C), de modo que as cepas se tornassem resistente as concentrações de 1 µg/mL de rifampicina e 40 µg/mL de estreptomicina, respectivamente. A indução de resistência aos antibióticos foi confirmada por meio de plaqueamento em Ágar Muller Hinton (AMH) suplementado com cada antibiótico nas concentrações previamente estabelecidas, quando foi observado padrão de crescimento semelhante às cepas parentais (não adaptadas). As cepas resistentes foram mantidas em CMH contendo

antibiótico e glicerol (15 g/100 mL) a - 20 °C. As culturas de uso nos ensaios de comportamento nas amostras de queijo de coalho foram mantidas em CMH contendo antibióticos a 4 °C, sendo mensalmente transferidos novos repiques das culturas estoque.

3.5 PREPARAÇÕES DOS INÓCULOS DAS CEPAS TESTE

Antes da utilização nos experimentos, LM-ATCC 7644NA+ e LM-ATCC 19115NA+, SA-ATCC 19095Rif+ e SA-ATCC 13565Str+ foram cultivadas duas vezes em CMH contendo 50 µg/mL de ácido nalidíxico, 1 µg/mL de rifampicina ou 40 µg/mL de estreptomicina, respectivamente, a 30 °C ou 37 °C por 18 - 20 h. Em seguida, as células foram recolhidas por meio de centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl, 0,85 g/100 mL) e suspensas em solução salina estéril de modo a se obter suspensões que apresentavam leitura OD a 625 nm (OD₆₂₅) de 0,1 de absorbância para *L. monocytogenes* e para *S. aureus*. Estas suspensões foram diluídas (1 : 10) em solução salina estéril e semeadas em AMH de modo a apresentar contagens de células viáveis de, aproximadamente, 8 log UFC/mL.

Para inoculação nas amostras de queijo, as suspensões foram preparadas e diluídas em solução salina estéril de modo a conter 7 log UFC/mL e 5 log UFC/mL de células viáveis para obtenção de inóculos 10⁵ e 10³ UFC /g da amostra, respectivamente.

3.6 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS DE QUEIJO, PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO E CONTAGEM BACTERIANA

As amostras de queijo de coalho foram removidas assepticamente das embalagens comerciais, cortada em fatias de 25 g (aproximadamente 3,8 cm de largura, 5,5 cm de comprimento e 1,1 cm de altura) sobre uma superfície de vidro de corte esterilizada utilizando uma faca de aço inoxidável esterilizada, e colocadas em sacos esterilizados de propileno (volume 400 mL) no ambiente da câmara de fluxo laminar.

O procedimento de inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar a partir de uma primeira suspensão contendo as cepas teste em concentração de,

aproximadamente, 7 log UFC/mL para fornecer contagens iniciais em torno de 5 log UFC/g queijo; e de uma segunda suspensão de 5 log UFC/mL para fornecer contagens iniciais de contaminação em torno de 3 log UFC/g nas amostras de queijo de coalho. Dessas suspensões, foram retirados 100 µL e distribuídos em dez alíquotas de 10 µL dispensadas em dez pontos distintos na superfície da amostra de queijo, a qual foi previamente acondicionada durante 4 h na respectiva temperatura de incubação. O inóculo considerado baixo (3 log UFC/g) foi escolhido de forma a simular um nível provável de contaminação pós-processo em queijos (LEKKAS et al., 2006), enquanto o inóculo mais elevado (5 log UFC/g) foi escolhido com a finalidade de se avaliar a influência do nível de contaminação sobre o crescimento bacteriano nas amostras de queijo.

Após a inoculação, as amostras de queijo foram acondicionadas em sacos de propileno comercialmente esterilizados (volume 400 mL) e mantidas na câmara de fluxo laminar durante 30 min para absorção completa das suspensões bacterianas inoculadas. Em seguida, as embalagens foram fechadas hermeticamente e armazenadas a $7,5 \pm 0,5$ °C ou a $12 \pm 0,5$ °C. Um estudo de campo realizado para determinar as temperaturas de armazenamento de queijo de coalho (n: 100) em supermercados locais (João Pessoa - Brasil) verificou que temperaturas de amostras de queijo de coalho comerciais variavam de 7,8 - 13,8 °C (DE ARAÚJO, 2016). Para este estudo, a temperatura de armazenamento de 7,5 °C foi selecionada por representar um valor próximo da temperatura mais baixa detectada em amostras de queijo de coalho comerciais; enquanto, a temperatura de 12 °C foi selecionada por representar a mais alta temperatura de armazenamento permitida pela legislação vigente para este tipo de produto (BRASIL, 1997).

Em diferentes intervalos de armazenamento (0 h - imediatamente após a inoculação, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d e 14 dias), foram determinadas as populações das cepas inoculadas nas amostras de queijo coalho. Para isso, as amostras inoculadas com as cepas foram suspensas em 225 mL de água peptonada esterilizada (0,1 g/100 mL) na proporção de 1:9, e homogeneizadas com auxílio do equipamento Stomacher (A440 Modelo, Marconi Equipar Lab. Ltda., Piracicaba, Brasil), durante 3 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-7}) das amostras em água peptonada, e uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada por meio de espalhamento em superfície em AMH contendo 50 µg/mL de ácido nalidíxico para ambas LM-ATCC

7644NA⁺ e LM-ATCC19115NA⁺, e em AMH contendo 1 µg/mL de rifampicina ou 40 µg/mL de estreptomicina para SA-ATCC19095Rif⁺ e SA-ATCC13565Str⁺, respectivamente, seguido de incubação a 30 ou 37 °C durante 24 - 48 h, respectivamente. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de células viáveis de acordo com a metodologia proposta Romeiro (2007), e os resultados foram expressos como log UFC/g. Amostras de queijos não inoculadas foram testadas de forma semelhante sendo utilizadas como amostras controle.

Durante o período de armazenamento (0, 1, 7 e 14 dias), as amostras de queijo foram avaliadas quanto ao pH, acidez titulável em ácido láctico, gordura na matéria seca e teor de sal (cloretos), utilizando os mesmos procedimentos citados anteriormente (item 3.3).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em duas repetições, em experimentos distintos, sendo utilizadas três amostras de queijo em cada repetição (triplicata), em um delineamento experimental em bloco randomizado com um esquema fatorial (cepa de cada bactéria x dose do inóculo x temperatura de armazenamento). As diferenças entre as contagens (UFC/g) obtidas para as cepas testadas e entre os valores dos parâmetros físico-químicos em amostras de queijo inoculados (ou não) com diferentes doses de inóculo e armazenadas em diferentes temperaturas foram verificadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos com $p \leq 0,05$. Para isso, foi usado o software computacional GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., Califórnia, EUA).

REFERÊNCIAS

- ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 489-493, 2003.
- ADAMI, F. S.; BOSCO, S. M. D.; ALTENHOFEN, G. et al. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Linguiças e Queijos. **Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 2015.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168, p. 57-62, 2014.
- AKINDOLIRE, M. A.; KUMAR, A.; ATEBA, C. N. Genetic characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from milk in the North-West Province, South Africa. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015.
- AKINEDEN, Ö.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 211-216, 2008.
- ALLERBERGER, F.; BAGÓ, Z.; HUHULESCU, S.; PIETZKA, A. Listeriosis: The dark side of refrigeration and ensiling. In: **Zoonoses-Infections Affecting Humans and Animals**. Springer Netherlands, 2015. p. 249-286.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 16-23, 2010.
- ALMEIDA, G.; MAGALHÃES, R.; CARNEIRO, L.; SANTOS, I.; SILVA, J.; FERREIRA, V.; HOGG, P.; TEIXEIRA T. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants **International Journal of Food Microbiology**. v.167 p. 303–309, 2013.
- ALMEIDA, G.; MORVAN, A.; MAGALHÃES, R.; SANTOS, I.; HOGG, T.; LECLERCQ, A.; TEIXEIRA, P.; TEAM, R. Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994–2007. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**. v.29, p.1219 –122, 2010.

ALOMAR, J.; LOUBIERE, P.; DELBES, C.; NOUAILLE, S.; MONTEL, M. C. Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 502-508, 2008.

ALONZO, L.D. F.; BOBO, D.J.; SKIEST, N.E.; FREITA, G. Evidence for subpopulations of *Listeria monocytogenes* with enhanced invasion of cardiac cells **Journal of Medical Microbiology**. v. 6, p. 423–434, 2011.

AL-TARAZI, Y. H.; ALBETAR, M. A.; ALABOUDI, A. R. Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 374-379, 2009.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A., BROUSSOLLE, V., COLIN, P., NGUYEN-THE, C., PRIETO, M. The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 99-109, 2015a.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; LEONG, D.; HICKEY, B. et al. The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. **Food Research International**, v. 75, p. 233-243, 2015b.

ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, L. A.; DO ROSÁRIO, C. M.; SALES, S. S. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís-MA. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n. 2, 2009.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.; SUZUKI, K.; et al. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v. 18, p. 630–634, 2007.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012. 3000p.

ÁVILA, M. DE O.; SANTOS, P. H. DA S.; DE GOIS, F. N. et al. A importância do controle das condições microbiológicas e higiênicas sanitárias na prevenção de

doenças transmitidas por alimentos-uma revisão de literatura. **Revista Expressão Científica**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2016.

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n.2, p. 99-106, 2011.

BARANCELLI, G. V.; CAMARGO, T. M.; GAGLIARDI, N. G.; PORTO, E.; SOUZA, R. A.; CAMPIONI, F. Pulsed field gel electrophoresis chracterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 21-29, 2014.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A.. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. **Guimarães: Forvisão**, 2003.

BASTOS, M. do S. R; NASSU, R. T; BORGES, M. de F.; SILVA, J. B. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando a implantação das boas práticas de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 321, p. 130-136, 2001.

BAYLIS, C. L. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 293-307, 2009.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; FREITAS, A. N. M. D. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo cru de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no Estado de Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 139-153, 2001.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4, p. 259-274, 2001.

BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R., RUPP, R. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.

BERNINI, V.; BOTTARI, B.; DALZINI, E.; SGARBI, E.; LAZZI, C.; NEVIANI, E.; ATTITHE, M. The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life. **Food Control**, v.34, p. 323–330, 2013.

BOEKEL, M. V. G.; JELLEMA, T. J.; NOOMEN, A.; ALMUDI, A. O.; ROSA, M., WALSTRA, T.; WALSTRA, P. I. E. T. E. R. P. **Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos**. Acribia,, 2001.

BONSAGLIA, E. C. R.; SILVA, N. C. C.; JÚNIOR, A. F.; JÚNIOR, J. A.; TSUNEMI, M. H.; RALL, V. L. M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 386-391, 2014.

BORGES, M. DE F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas Brasil, 199 p. 2006.

BORGES, M. DE F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C. R. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos UFPR**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

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

BRANCO, M. A. D. A. C., FIGUEIREDO, E. A. T. D., BORGES, M. D. F., SILVA, M. C. D. D., DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 398-408, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro 2001. Seção 1, nº 7-E, p.1415-53. 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Anexo I: Regulamento Técnico de identidade e

qualidade de queijos. Anexo II: Regulamento Técnico geral para a fixação dos requisitos microbiológicos de queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de março de 1996. p. 3977-3978.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997. Seção 1, p. 19697.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Anexo II-Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº135-E, 16 de julho de 2001. 2001a.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30, de 07 de agosto de 2013. Trata dos novos procedimentos para registro de queijos artesanais tradicionalmente produzidos a partir de leite cru. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 de agosto de 2013. Seção 1 p. 19.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por alimentos**.2015. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf> > Acesso em: 26 de julho de 2016.

BROOKS, J. C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R.. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 154-158, 2012.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, AK. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. Caracterização de microbiota lática isolada de queijos de Coalho comercializados no Rio Grande do Norte. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS,2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: VC Eventos, 2007. 1 CD-ROM.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Documentos, 2009.

BRUST, T.; COSTA, T. M. D.; AMORIM, J. C. et al. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the PVL gene outbreak in a Public Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 865-868, 2013.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. T. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 865-870, 2001.

CÂMARA, S. A. V.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S. et al. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CAMEJO, F. A.; CARVALHO, O. REIS,; E. LEITÃO,; S. SOUSA,; D. CABANES. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 379–394, 2011.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; AMATISTE, S. et al Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, 2015.

CARLONI, E.; PETRUZZELLI, A.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; CAVERNI, F.; MANGILI, P.; TONUCCI, F. Effect of farm characteristics and practices on hygienic quality of ovine raw milk used for artisan cheese production in central Italy. **Animal Science Journal**, 2015.

CARRASCOSA, C.; MILLÁN, R.; SAAVEDRA, P. et al. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2606-2616, 2016.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceara e suas propriedades tecnológicas**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp. 2007

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido láticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205-14, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC (2013). Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.62, n. 15, p.283-287, 2013.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC (2016). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Current Search: 2010 to 2015. 2016. Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> >Acesso: 10 de agosto de 2016.

CHA, J.; LEE J.; JUNG, Y.; YOO, J.; PARK, Y.; KIM, B.; LEE, Y. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 864-871, 2006.

CHAIBENJAWONG, Plykaeow; FOSTER, Simon J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 2, p. 125-135, 2011.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGES, M. C.; CORNET, M.; CRUTZ-LE C. O.Q.; DUDEZ, A. M.; MARTIN, V.; ZAGOREC, M. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1527-1533, 2005.

CHAN, C. Y.; WIEDMANN, M.. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 237–253, 2009.

CHAO, G.; ZHOU, X.; JIAO, X.; QIAN, X.; XU, L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 3, p. 277-284, 2007.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120-127, 2009.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

CHEN, M.; WU, Q.; ZHANG, J.; YAN, Z.; WANG, J. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China **Food Control**. v.38, p. 1–7, 2014.

CHO, K. H.; PACHEPSKY, Y, A.; OLIVER, D. M. et al. Modeling fate and transport of fecally-derived microorganisms at the watershed scale: State of the science and future opportunities. **Water Research**, v. 100, p. 38-56, 2016.

CHOMA, C.; GUINEBRETIERE, M. H.; CARLIN, F.; SCHMITT, P.; VELGE, P.; GRANUM, P. E.; NGUYEN-THE, C. Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 617-625, 2000.

COELHO, M. C; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; COGAN, T.M. Microbiology of cheese. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Second edition, p. 625–631, 2011.

COLOMBARI, V.; MAYER, M. D. B.; LAICINI, Z. M. et al. Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. **Journal of Food Protection®**, v. 70, n. 2, p. 489-493, 2007.

COSSU, F.; SPANU, C.; DEIDDA, S.; MURA, E. et al. *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat sandwiches collected from vending machines. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 2, 2016.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 134-147, 2010.

D'AMICO, D. J.; DRUART, M. J.; DONNELLY, C. W. 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1563-1571, 2008.

DANTAS, D. S.; ARAÚJO, A. M.; SANTOS, J. O. et al. 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.

DE ARAÚJO, V. G. **Estudo preditivo da sobrevivência e crescimento de bactérias patogênicas em queijo de coalho**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Nutrição. UFPB. 2016.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2001.

DE JESUS, A. R.; VIDOTTI, A. C.; FERNANDES, A. M.; LOPES, D. D. C.; SILVA, F. M. V.; GRACIANO, J. DOS S.; MIRANDA, C. F. Imagens digitais no estudo do envelhecimento do queijo minas frescal: um estudo comparativo sobre diferentes embalagens. **E-xacta**, v. 9, n. 1, p. 23-36, 2016.

DELBRASSINNE, L.; BOTTELDOORN, N.; ANDJELKOVIC, M.; DIERICK, K.; DENAYER, S. An emetic *Bacillus cereus* outbreak in a kindergarten: detection and quantification of critical levels of cereulide toxin. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 84-87, 2015.

DELEO, Frank R. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, 2010.

DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; FORTES, E. et al. *Listeria floridensis* sp. nov.,

Listeria aquatica sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1882-1889, 2014.

DIAS, J. N.; FONTINELE, L. L.; MACHADO, S. M. O.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no Norte do Piauí. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DIEZHANDINO, I.; FERNÁNDEZ, D.; GONZÁLEZ, L. et al. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry**, v. 168, p. 134-141, 2015.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DO CARMO, L. S., DIAS, R. S., LINARDI, V. R., DE SENA, M. J., DOS SANTOS, D. A., DE FARIA, M. E., HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

D'ORAZIO, S. E. F. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 15, 2014.

DUARTE, D. A. M., SCHUCH, D. M. T., SANTOS, S. B., RIBEIRO, A. R., VASCONCELOS, A. M. M., SILVA, J. V. D., MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto. Biológico**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

EUROPEAN COMMISSION (EC 2005).. Regulation No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Union**. L338, 1e26. 2005.

EUROPEAN COMMISSION. (EC 2007). Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 322, p. 12-29. 2007

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY ANALYSIS EFSA (2012). Of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat (RTE) foods in the EU, 2010–2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. **European Food Safety Authority Journal**, v.11 p.75, 2012.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA. (2015b).. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **European Food Safety Authority Journal**, v.13, p. 3991. 2015b.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2015a). *Campylobacter* and *Listeria* infections still rising in the EU – say EFSA and ECDC. 17 December 2015b. Disponível em: www.efsa.europa.eu/en/press/news/151217.

EL-BAKRY, M; SHEEHAN, J. Analysing cheese microstructure: A review of recent developments. **Journal of Food Engineering**, v. 125, n. 13, p. 84-96, 2014.

ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G.; BLAIOTTA, G. et al. PCR–DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 263-270, 2004.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; DA FRANÇA SANTOS, G. C.; DOS SANTOS SOUZA, J.; DE 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.

FAO/WHO Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Geneva. **Microbiological Risk Assessment Series**. n. 4, 2004.

FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of the United Nation. (2007). Coalho Cheese. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-au133e.pdf>. Acesso em 25 de junho de 2016.

FDA (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). (2010). Morningland Dairy Conducting Nationwide Voluntary Recall of All Cheese Labeled as Morningland Dairy and Ozark Hills Farm because of possible health risk. Disponível em: <http://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm224494.htm>. >Acesso em: 9 de marco de 2015.

FDA (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION).(2015).Risk Assessment Summary: *Listeria monocytogenes* in cheese. 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/ucm338618.pdf> > Acesso em: 12 de agosto de 2016.

FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2016) Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods - Chapter 3. Factors that Influence Microbial Growth Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094145.htm> > Acesso em 12 de agosto de 2016.

FEITOSA, T.; BORGES, M. DE F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E. H. 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. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.162-165, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos fermentados - Aspectos bioquímicos e tecnológicos, 2º. ed. **Cadernos Didáticos**, 43 Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 112 p

FLEUROT, Isabelle et al. Following pathogen development and gene expression in a food ecosystem: the case of a *Staphylococcus aureus* isolate in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5106-5115, 2014.

FLICK, G. J.; GRANATA, L. A. Biogenic amines in foods. **Toxins in Food**, p. 121-154, 2005.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND (FSANZ). Criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-foods. 2014. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/code/microbiolimits/Pages/Criteria-for-Listeria-monocytogenes-in-ready-to-eat-foods.aspx> > Acesso em: 10 de maio de 2016.

FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND FSANZ (2013). Duetto Cheese-microbial contamination (*Listeria monocytogenes*), 2013. Disponível: <http://www.foodstandards.gov.au/industry/foodrecalls/recalls/Pages/duettocheesemi-crobia5802.aspx> > Acesso em 10 de maio de 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2013, 607 p.

FOX, E.; O'MAHONY, T.; CLANCY, M. et al. *Listeria monocytogenes* in the Irish

dairy farm environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1450-1456, 2009.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects**. Academic Press, 2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FOX, P.F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. et al. **Fundamentals of Cheese Science**. Maryland: Ed. Aspen Publication, 2000. 587 p.

FRANCIOSI, E., SETTANI, L., CAVAZZA, A., POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3 – 11, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 182p., 2008.

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

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 35-42, 2013.

FRETZ, R.; PICHLER, J.; SAGEL, U.; MUCH, P.; RUPPITSCH, W.; PIETZKA, A. T.; WERBER, D. et al. Update: Multinational listeriosis outbreak due to ‘Quargel’, a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. 2010.

FUQUAY, J. W., FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of dairy sciences**. Academic Press, 2011.

FUSCO, V.; QUERO, M. G. Nucleic acid-based methods to identify, detect and type pathogenic bacteria occurring in milk and dairy products. In A. Amer Eissa (Ed.), **Structure and Function of Food Engineering** . pp. 371-404. InTech. 2012.

GALLINA, S.; BIANCHI D. M.; BELLIO A, et al. Staphylococcal poisoning foodborne outbreak: epidemiological investigation and strain genotyping. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 12, p. 2093-2098, 2013.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1, p. 51-70, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: NBL Editora, p.511. 2009.

GOULET, V.; KING, L. A.; VAILLANT, V.; DE VALK, H. What is the incubation period for listeriosis?. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

GRAPPIN, R., BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p. 751-761, 1997.

GRASSI NETO, Roberto. **Segurança Alimentar: da produção agrária à proteção do consumidor**. São Paulo: Saraiva, 2013.

GRAVELAND, Haitske et al. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 630-634, 2011.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal and industrial "coalho" cheese against indicator microorganisms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

GUILBAUD, M.; PIVETEAU, P.; DESVAUX, M.; BRISSE, S.; BRIANDET, R. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the

honeycomb-like morphotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1813-1819, 2015.

HALPIN-DOHNALEK, Margaret I.; MARTH, Elmer H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods-a review. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 4, p. 267-282, 1989.

HAMADI, F.; ASSERNE, F.; ELABED, S.; BENSOUDA, S.; MABROUKI, M.; LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v. 38, p. 104-108, 2014.

HARA-KUDO, Y.; KONUMA, H.; KAMATA, Y.; MIYAHARA, M.; TAKATORI, K.; ONOUE, Y.; OHNISHI, T. et al. Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 8, p. 1450-1458, 2013.

HANNON, J. A.; WILKINSON, M. G.; DELAHUNTY, C. M.; WALLACE, J. M.; MORRISSEY, P. A.; BERESFORD, T. P. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 313-323, 2003.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. **Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker**, p. 151-206, 2001.

HE, W.; LIU, Y.; QI, J.; CHEN, H. et al. Food-animal related *Staphylococcus aureus* multidrug-resistant ST9 strains with toxin genes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 9, p. 782-788, 2013.

HENNEKINNE, A. J.; DE BUYSER, L. M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v.36, p. 815-836, 2012.

HUANG, B.; DENG, Z. A.; TAN, M. X.; LIAO, Y. H. Contamination status, staphylococcal enterotoxin-producing property and drug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from food products [J]. **Chinese Journal of Health Laboratory Technology**, v. 6, p. 073, 2009.

HYEON, J. Y.; CHUNG, G. T.; BING, S. H. et al. A foodborne outbreak of *Staphylococcus aureus* associated with fried chicken in Republic of Korea. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 85-87, 2013.

IMANISHI, M.; ROUTH, J. A.; KLABER, M.; GU, W.; VANSELOW, M. S.; JACKSON, K. A.; CALLAGHAN, W. M. Estimating the Attack Rate of Pregnancy-Associated Listeriosis during a Large Outbreak. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2015, 2015.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS IFT. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Disponível em: www.cfsan.fda.gov/~comm/ifttoc.html. Acesso: 18 de agosto de 2015.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, p. 142-148, 2009.

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBO, R.; SUNDE, E. B.; SKJERVHEIM, M. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 492-496, 2011.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 711. 2005.

JONES, R. J., HUSSEIN, H. M., ZAGOREC, M., BRIGHTWELL, G., TAGG, J. R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 228-234, 2008.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 267-272, 2005.

KNIGHT, A. J.; WOROSZ, M. R.; TODD, E. C.; BOURQUIN, L. D.; HARRIS, C. K. *Listeria* in raw milk soft cheese: a case study of risk governance in the United States using the IRGC framework. In: **Global risk governance**. Springer Netherlands, p. 179-220, 2008.

KOCH, J.; DWORAK, R.; PRAGER, R.; BECKER, B.; BROCKMANN, S.; WICKE, A.; WICHMANN-SCHAUER, H.; HOF, D. H.; WERBER, K. Stark Large listeriosis

outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, p. 1581–1584, 2010.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 02, n. 01, p. 63-76, 2003.

LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A. *Listeria* et listériose: des animaux d'élevage à nos assiettes. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 1, p. 17-22, 2009.

LEE, H.; RANKIN, S. A.; FONSECA, L. M.; MILANI, F. X. Lactose and galactose content in cheese results in overestimation of moisture by vacuum oven and microwave methods. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2567-2577, 2014.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; SILVA, M. D.; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em Queijo do tipo "Coalho" comercializado em Salvador (BA). Importância para a Saúde Pública. **Revista Analytica**, n. 02. p. 38-41, 2002.

LEITE JÚNIOR, A. F.; FLORENTINO, E. R.; DE OLIVEIRA, E. B.; SÁ, S. N. D.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 53-9, 2000.

LEKKAS, C.; KAKOURI, A.; PALEOLOGOS, E. et al. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 C. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 268-276, 2006.

LI, G.; WU, S.; LUO, W.; SU, Y.; LUAN, Y.; WANG, X. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 Isolates from Food-Poisoning Outbreaks (2006–2013) in Xi'an, China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 3, p. 203-206, 2015.

LIN, J.; YEH, K. S.; LIU, H. T.; LIN, J. H. *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 3, p. 608-611, 2009.

LITTLE, C. L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S. K. et al. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 304-312, 2008.

LIU, X.; Chen, Y.; Fan, Y.; Wang, M. [Foodborne diseases occurred in 2003--report of the National Foodborne Diseases Surveillance System, China]. **Wei Sheng Yan Jiu= Journal of Hygiene Research**, v. 35, n. 2, p. 201-204, 2006.

LOPEZ-VALLADARES, G.; THAM, W.; PARIHAR, V. S. et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958–2010). **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 11, p. 2251-2260, 2014.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. DE F.; PORTO, B. DE C.; DE SOUSA, C. T.; DE OLIVEIRA, F. E. M. Interferência da microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus* coagulase positiva. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 337-341, 2011.

MAIA, G. M. I. **Estudo dos aspectos tecnológicos e sensoriais do queijo de coalho com quitosana**. Dissertação de Mestrado em Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. UFCE. 2013.

MALLET, A.; GUÉGUEN, M.; KAUFFMANN, F. et al. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. **International Dairy Journal**, v. 27, n. 1, p. 13-21, 2012.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

MEDEIROS, J. M. S. **Produção artesanal de queijos: avaliação das condições de processamento, da qualidade higiênico sanitária e físico-química de queijos tipo coalho e manteiga**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. UFERSA, 2016.

MEDEIROS, R. S.; ARAÚJO, L. M.; QUEIROGA NETO, V. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. **CyTA-Journal of Food**, p. 1-8, 2016.

MELO, J.; ANDREW, P. W.; FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, p. 75-90, 2015.

MENDES, E. A. S.; PIRES, C. V.; DA SILVA, A. M. et al. Qualidade do leite cru refrigerado em função do tipo de ordenha coletado de produtores do município de Paracatu-MG. **Zootecnia**, v. 1, n. 2, p. 63-71, 2014.

MENDONÇA, M. G.; LEHFELD, L. S. Programa de aquisição de alimentos e pagamentos por serviços ambientais: uma nova proposta de sustentabilidade quanto ao uso dos recursos naturais e segurança alimentar. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Processo Coletivo e Cidadania**. 2015. p. p. 176-182.

MENESES, R. B. D.; CARDOSO, R. D. C. V.; GUIMARÃES, A. G.; GÓES, J. Â. W.; SILVA, S. A. D.; ARGOLO, S. V. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. UFBA. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/15584> > Acesso em 28 de agosto de 2016.

MENEZES, I. R.; DE ALMEIDA, A. C.; MORÃO, R. P.; REIS, S. V.; SANTOS, C. A.; LOPES, I. L. N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 1, 2015.

MIRANDA, G. R.; SOUZA, A. M.; MARTINS, A. D. DE O.; COCARO, E. S.; MARTINS, J. M. Queijos artesanais: qualidade físico-química e microbiológica e avaliação das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e ambiente de produção. **Extensão Rural**, v. 23, n. 1, p. 78-92, 2016.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, 2014.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie -Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1320-1324, 2010.

MORANDI, S.; CREMONESI, P.; PEREZ, G. et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 586-591, 2007.

MUNCK, A. V. Queijo de Coalho—Princípios básicos da fabricação (Palestra). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 13-15, 2004.

MURRAY, R. J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. s2, p. S106-S119, 2005.

NACMCF NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS et al. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. **Journal of Food Protection** v. 73, n. 1, p. 140-202, 2010.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. D. S.; BORGES, M. D. F.; LIMA, J. R.; MACÊDO, B. A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. **EMBRAPA Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2001.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de Coalho. Coleção Agroindústria Familiar. **EMBRAPA, Informação Tecnológica**. Brasília, DF, v.1, p.40, 2006.

NASSU, R. T.; MOREIRA, C. G.; ROCHA, R. D. A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. DE F.; MACEDO, A. A. M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, p. 121-6, 2000.

NEAVES, P.; WILLIAMS, A. P. 11 Microbiological Surveillance and Control in Cheese Manufacture. **Technology of Cheese Making**, v. 14, p. 384, 2010.

NERO, L. A., MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., ORTOLANI, M. B. T., FRANCO, B. D. G. M. Autochthonous microbiota of raw milk with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 2, p. 261-270, 2009.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H., OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases -The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 3-15, 2010.

NICOLAU, E. S.; KUAYE, A. Y.; MESQUITA, A. J. et al. Qualidade microbiológica dos queijos tipo minas frescal, prato e mussarela comercializados em Goiás. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 200-5, 2001.

NÖRNBERG, MARIA FBL et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.

NUNES, D. M.; JÚNIOR, P.; MELO, J. S.; DE OLIVEIRA, E. C.; MENEGUINI, V. C.; DIAS, F.; DIMECH, G. S. I. Outbreak of foodborne disease at a mass event of indigenous peoples in Cuiaba, Mato Grosso, Brazil, in 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 195-202, 2016.

NYARKO, E. B.; DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: Strain Heterogeneity, Methods, and Challenges of Subtyping. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2868-M2878, 2015.

OLIVEIRA, K. A.; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J. D.; MELO, L. E. H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 435-440, 2010.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2117-2131, 2010.

OZFOODNET WORKING GROUP et al. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet Network, 2009. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 34, n. 4, p. 396–426, 2010.

OZFOODNET WORKING GROUP et al. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet Network, 2010. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 36, n. 3, p. E213–E241, 2012.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 512-542, 2007.

PECKA-KIELB, E.; VASIL, M.; ZACHWIEJA, A.; ZAWADZKI, W.; ELEČKO, J.; ZIGO, F.; FARKAŠOVÁ, Z. An effect of mammary gland infection caused by *Streptococcus uberis* on composition and physicochemical changes of cows' milk. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 1, p. 49-55, 2016.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIETRO, E.; SPANU, C.; SCARANO, C. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* using water bath heat treatment in vacuum packed Ricotta Salata cheese wedges. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 7, p. M1549-M1556, 2015.

PIMENTEL-FILHO, N. de J.; MANTOVANI, H. C.; CARVALHO, A. F de. et al. Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 2, p. 416-422, 2014.

PINTO, M. G. V., FRANZ, C. M., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 205-214, 2006.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 340-352, 2005.

PU, Shuaihua; WANG, Fei; GE, Beilei. Characterization of toxin genes and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 2, p. 299-306, 2011.

QUEIROGA, R. C. R. E.; GUERRA, I. C. D.; DE OLIVEIRA, C. E. V. DE OLIVEIRA, M. E. G., DE SOUZA, E. L. Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de queijo “tipo minas frescal” de leite de cabra condimentado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 363-372, 2009.

QUEIROGA, R. C. R. E.; GOMES, J. J.L.; DUARTE, A. M. et al. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 18-24, 2013.

QUERO, G. M.; FUSCO, V.; COCCONCELLI, P. S. et al. Microbiological, physico-chemical, nutritional and sensory characterization of traditional Matsoni: selection and use of autochthonous multiple strain cultures to extend its shelf-life. **Food Microbiology**, v. 38, p. 179-191, 2014.

RAKHMAWATI, T. W.; NYSEN, R.; AERTS, M. Statistical analysis of the *Listeria monocytogenes* EU-wide baseline survey in certain ready-to-eat foods Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. **European Food Safety Authority Journal Supporting Publications**, v. 10, n. 6, 2013.

RAKHMAWATI, T. W.; NYSEN, R.; AERTS, M. Statistical analysis of the *Listeria monocytogenes* EU-wide baseline survey in certain ready-to-eat foods Part B: analysis of factors related to the prevalence of *Listeria monocytogenes*, predictive models for the microbial growth and for compliance with food safety criteria. **European Food Safety Authority Journal Supporting Publications**, v. 11, n. 8, 2014.

RAMPELOTTO, R. F.; HÖRNER, R.; SILVA, D.; WUST, V.; DAMMER, J. R. S. Relação entre a resistência aos antimicrobianos com a produção de biofilme em *Staphylococcus coagulase negativo*. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.

REHMAN, S. U., BANKS, J. M., MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1, p. 45-53, 2000.

REIS, K. T. M. G.; DE SANTANA, E. H. W.; ROIG, S. M. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão. **Journal of Health Sciences**, 2015.

RESENDE, M. F.; COSTA, H. H.; ANDRADE, E. H.; ACÚRCIO, L. B.; DRUMMOND, A. F.; CUNHA, A. F.; SOUZA, M. R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. D. F.; ABREU, L. D.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, n. 29, p. 113-117, 2005.

ROBERTSON, K.; GREEN, A.; ALLEN, L.; IHRY, T.; WHITE, P.; CHEN, W. S.; LEVINE, J. et al. Foodborne Outbreaks Reported to the US Food Safety and Inspection Service, Fiscal Years 2007 through 2012. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 3, p. 442-447, 2016.

ROBINSON, Richard K. (Ed.). **Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products**. John Wiley & Sons, 2005.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A.; AL-OTAIBI, M. M. Reducing salt in Feta. **Dairy Industries International**, v. 67, n. 6, p. 16-18, 2002.

RODRIGUEZ-CATURLA, M. Y.; DÍAZ, A. V., VALLEJO, J. L. R., GARCÍA-GIMENO, R. M., & COSANO, G. Z. Effect of pre-incubation conditions on growth and survival of *Staphylococcus aureus* in sliced cooked chicken breast. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 409-416, 2012.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Real-time PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. D. Rodríguez-Lázaro (Ed.), Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications, Ed. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, pp. 79–90, 2013.

ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9>. Pdf > acesso em 28/07/2016, 2007.

ROSSHAUG, P. S.; DETMER, A.; INGMER, H. LARSEN, M. H. Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue-white cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8508-8514, 2012.

RUWER, C.M.; DE MOURA, J.F.; GONÇALVES, M.J.F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SALMINEN, Seppo; VON WRIGHT, Atte (Ed.). **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. CRC Press, 2004.

SAMELIS, J.; IKEDA, J. S.; SOFOS, J. N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157: H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 563-575, 2003.

SANDES, Aline Batista et al. Contagem de micro-organismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada de propriedades do

recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 2, p. 271-289, 2016.

SANTANA, E. H. W. de; BELOTI, V.; BARROS, M. de A. F. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88, p. 27-33, 2001.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C.C. et al. Microbial quality of "coalho" cheese commercialized in Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SANTOS, E. S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicrotróficos: conseqüências de sua presença em leites e queijos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 2, p. 129-138, 1999.

SATO'O, Y.; OMOE, K.; NAITO, I.; ONO, H. K.; NAKANE, A.; SUGAI M. et al. Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2637-2640, 2014.

SAUDERS, B. D.; D'AMICO, D. J. *Listeria monocytogenes* cross-contamination of cheese: risk throughout the food supply chain. **Epidemiology and Infection**, p. 1, 2016.

SCHAFFNER, E.; MÜHLEMANN, M.; SPAHR, U.; SCHÄLLIBAUM, M. [Quantification of the probability of milk contamination by *Listeria monocytogenes* during manufacture of hard cheese]. **Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique**, v. 51, n. 5, p. 493-503, 2003.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; THORUP COHN, M. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011.

SCHLECH, F. W. Foodborne listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**. v.31, p. 770-775, 2000.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A. et al. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 41-4, 2000.

SERRAINO, Andrea et al. Behaviour of *Salmonella* Typhimurium during production and storage of artisan water buffalo mozzarella cheese. **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 3, p. e53, 2012.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SHRESTHA, J.A. S.; GRIEDER, D.J.; MCMAHON, B.A. Numer Survival of *Listeria monocytogenes* introduced as a post-aging contaminant during storage of low-salt Cheddar cheese at 4, 10, and 21 °C. **Journal of Dairy Science**. v.94,p. 4329–4335, 2011.

SILK, B.; MAHON, B. **Control of Communicable Diseases Manual**. 19th ed. American Public Health Association, 2015.

SILVA, Á. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; , DESTRO, M. T.; REZENDE COSTA, M.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: Uma revisão. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 1, 2015.

SILVA, C. M. F. ***Staphylococcus aureus* no queijo São Jorge DOP: estudo da dinâmica do crescimento durante o fabrico e de possíveis fontes de contaminação**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade dos Açores. 2012.

SILVA, L. C.; FONSECA, C. R.; QUEIROZ, S. R. A.; ALENCAR, A. L. F.; GODOY, S. H. S.; MUNIN, F. S. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* potencialmente causadoras de toxi-Infecções alimentares em queijos coalho e ricota comercializados no Sudeste do Brasil. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 177-178, 2014.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I.; MORAES, J. O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

SOSPEDRA, I.; RUBERT, J.; SORIANO, J. M.; MANES, J. Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 418-422, 2013.

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

SOUSA JÚNIOR, D. L.; VANDESMET, V. C. S.; MENDES, C. F. C.; LEANDRO, L. M. G. Análise bacteriológica de queijos tipo coalho comercializados no município de Crato, Ceará. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 3, n. 8, 2015.

SOUSA, R. A. DE; FIGUEREDO, E. A. T. DE; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza, Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v.20, n.38, p.66-68, 2006.

STESSL, B.; FRICKER, M.; FOX, E.; KARPISKOVA, R.; DEMNEROVA, K.; JORDAN, K.; WAGNER, M. et al. Collaborative survey on the colonization of different types of cheese-processing facilities with *Listeria monocytogenes*. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 1, p. 8-14, 2014.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 107-113, 2002.

SUH, S. H.; DWIVEDI, H. P.; CHOI, S. J.; JAYKUS, L. A. Selection and characterization of DNA aptamers specific for *Listeria* species. **Analytical Biochemistry**, v. 459, p. 39-45, 2014.

SULLIVAN, D.; COTTER, P.; GIBLIN, L.; SHEEHAN, J.; MCSWEENEY, P. Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1, 2013.

SUZUKI, Y.; OMOE, K.; HU, D. L.; SATO'O, Y.; ONO, H. K. et al. Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 10, p. 570-580, 2014.

TEMELLI, S.; ANAR, Ş.; SEN, C.; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v. 17, n. 11, p. 856-861, 2006.

TIMM, C. D.; ROSS, T. B.; GONZALEZ, H. L. et al. Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 336, p. 75-80, 2004.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, n. 3, p. 205-229, 2010.

TOMPKINS, D. S.; WHEELER, J. G.; SETHI, D.; COWDEN, J. M. et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **British Medical Journal**, v. 318, n. 7190, p. 1046-1050, 1999.

TU, Z.; CHEN, Q.; LI, Y.; XIONG, Y.; XU, Y.; HU, N.; TAO, Y. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk. **Analytical Biochemistry**, v. 493, p. 1-7, 2016.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ, G.; GOEBEL, W. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 584-640, 2001.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 1996.

WALECKA-ZACHARSKA, E.; KOSEK-PASZKOWSKA, K.; BANIA, J. et al. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 216-221, 2013.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MÁRTA, D.; BORCH, E.; RÅDSTRÖM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International journal of food microbiology**, v. 141, p. S69-S74, 2010.

WANG, Y.; WANG, D.; ZHAN, S.; ZHENG, J.; TAO, Y. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and SpA polymorphisms in Ma'anshan City. **Journal of Public Health and Preventive Medicine**, v. 22, p. 50-53, 2011.

WANG, X.; MENG, J.; ZHANG, J.; ZHOU, T. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 142-147, 2012.

WANG, X.; LI, G.; XIA, X.; YANG, B.; XI, M.; MENG, J. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail foods in Shaanxi, China. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 4, p. 281-286, 2014.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 6, p. 245-254, 2009.

WHO (2015b) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **10 Facts on Food Safety**; 2015b. Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/en/. > Acesso em: 22 de março de 2016.

WHO (2015a) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Food Safety**. Fact Sheet No. 399. 2015a. Disponível em: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/fact-sheet.pdf> > Acesso em: 22 de março de 2016.

WHO (2016) WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne diseases**. 2016 Disponível em: http://who.int/topics/foodborne_diseases/en/ > Acesso em: 22 de março de 2016.

WHO (2015e) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **How Safe is Your Food?**. 2015e. Disponível em: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/en/>.> Acesso em: 22 de março de 2016.

WHO (2015c) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015**. World Health Organization, 2015c. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/> Acesso em: 22 de março de 2016.

WHO (2015d) WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Day 2015: Food Safety**; 2015d.

Disponível em: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/campaign-toolkit-en.pdf?ua=1&ua=1>> Acesso em: 22 de março de 2016.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–90. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 03, p. 519-531, 1993.

YAMAGUCHI, Mirian Ueda et al. Qualidade Microbiológica de Alimentos e de Ambientes de Trabalho: Pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*/Microbiological Quality of Food and Working Milieus: Research on *Salmonella* and *Listeria*. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 6, n. 3, p. 417, 2013.

YAN, X.; WANG B.; TAO, X.; HU, Q. et al. Characterization of the *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 01165-12, 2012.

YANG, L., LIU, Y., WU, H., SONG, Z., HOIBY, N., MOLIN, S., & GIVSKOV, M. Combating biofilms. **Federation of European Microbiological Societies Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 146-157, 2012.

YDE, M., NARANJO, M., MATTHEUS, W. et al. Usefulness of the European Epidemic Intelligence Information System in the management of an outbreak of listeriosis, Belgium, 2011. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 38, 2012.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H.. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201-215, 2016.

ZELENY, R. et al. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, p. 241-246, 2015.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO

The fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in coalho cheese during storage at 7.5 and 12 °C

Running title: Bacterial behavior in coalho cheese

Maria Digian de Oliveira Arruda^a, Valdenice Gomes de Araújo^a, Francisca Nayara Dantas Duarte^a, Janaína Maria Batista de Sousa^a, Maria Lúcia da Conceição^a, Donald Schaffner^b, Evandro Leite de Souza^{a*}

^a *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

^b *Department of Food Science, Rutgers, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, USA*

* Corresponding author:

Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Phone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

This study evaluated the survival of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese during 14 days as affected by the type of strain (*L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 13565, *S. aureus* 19095), the dose of contamination (3 and 5 log cfu/g) and the storage temperature (7.5 and 12 °C). Changes in physicochemical parameters in contaminated cheese samples were assessed over time. The populations of all tested strains were increased by the end of the storage period at 7.5 and 12 °C. The population of *L. monoytogenes* and *S. aureus* increased earlier when the cheese samples were stored at 12 °C. Populations of 3.9 - 6.2 and 4.3 – 6.4 log cfu/g for *L. monocytogenes*, and of 4.1 – 6.0 and 4.2 - 6.4 log cfu/g for *S. aureus*, were detected on the 14th day of storage at 7.5 and 12 °C, respectively. Minor changes in pH and titratable acidity were verified over time in contaminated cheese samples. These results indicate that *L. monocytogenes* and *S. aureus* can survive and growth in coalho cheese stored at 7.5 or 12 °C, but the growth is higher when the cheese is stored at 12 °C.

Key-words: low-ripened cheese, bacterial behavior, *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., contamination dose.

1. Introduction

Among a variety of Brazilian traditional cheeses, the coalho cheese is considered one of the most popular. Although the production of coalho cheese is restricted to the Brazilian northeastern region, this cheese is marketed in all country. Coalho cheese is produced by cow milk coagulation using rennet and/or other proper coagulating enzymes

that are usually complemented with lactic acid starter cultures, commonly composed by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, followed by a short ripening no longer than 10 days at 10 – 12 °C (Brazil, 1997; de Carvalho et al., 2015). The final product is characterized as a medium to high moisture (36 – 45%) cheese, with a pleasant mild acid-taste and flavor, semi-hard texture, yellowish-white color and absence of a well-defined rind, with commercialization at temperatures ≤ 12 °C (Brazil, 1997).

Considering the lower salt content, higher partition of oxygen, relatively high pH and moisture content in comparison to ripened hard-cheese, coalho cheese may be a favorable substrate for survival and growth of pathogenic bacteria (de Carvalho et al., 2015; de Souza et al., 2016). In addition to the intrinsic physicochemical characteristics, the behavior of pathogenic bacteria in cheese is influenced by the practices employed in manufacture and storage (Pintado et al., 2005; Bernini et al., 2013). The reported use of unsafe raw materials and inadequate hygienic-sanitary practices during the production of coalho cheese and storage (Santana et al., 2008; Silva et al., 2012) poses a potential risk to consumers. During the short ripening and storage, alterations in physicochemical characteristics of cheese may occur, e.g., pH variation, production of specific organic acids and other antagonistic compounds by background microflora, which may also influence the behavior of pathogenic bacteria in these products (Irlinger and Mounier, 2009; Schvartzman et al., 2011; Montel et al., 2014).

Studies have indicated that coalho cheese is susceptible for contamination with *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in doses enough to cause foodborne diseases (Feitosa et al., 2003; Luz, 2009; Evêncio-Luz et al., 2012; de Azevêdo et al., 2014; Silva et al., 2014). This is of particular concern because cheese is a ready-to-eat product and often consumed directly without any final bactericidal processing step (Silva et al., 2014). *L. monocytogenes* is the causative agent of listeriosis

that is usually a severe disease with a mean mortality rate of at least 20% (Valero et al., 2014), and dairy products are often sources of this infection (Bille et al., 2006; Bernini et al., 2013). *S. aureus* is a pathogen associated with both animal and human diseases including mastitis, toxic-shock syndrome and staphylococcal food-poisoning (Le Loir et al., 2003). The staphylococcal food-poisoning is caused by ingestion of food containing pre-formed heat-stable staphylococcal enterotoxins (Balaban and Rasooly, 2000; Rosengren et al., 2010). Minimally-ripened cheeses have been involved in staphylococcal food-poisoning in different countries (Sabioni et al., 1988; Ostyn et al., 2010; Johler et al., 2015).

Although some investigations have been carried out on physicochemical and microbiological characteristics of coalho cheese, studies on the behavior of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in this product are still lacking. Moreover, a previous predictive analysis (using static growth models of ComBase Predictor; <http://modelling.combase.cc/>) of survival and growth of different pathogenic bacteria in function of the combination of different values of pH (5.59 – 7.13), a_w (0.89 – 0.97) and temperature (7.8 – 13.8 °C) detected in commercial coalho cheese samples estimated the lowest maximum growth rates for *L. monocytogenes* and *S. aureus* under the tested conditions (unpublished data). In this context, this study evaluated the fate of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in artificially contaminated coalho cheese samples as affected by the type of strain, the dose of contamination and storage temperature. Changes in physicochemical parameters of inoculated coalho cheese samples were also assessed over time.

2. Material and methods

2.1 Cheese samples and physicochemical analyses

The coalho cheese samples with legal registration by Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA, Brazil) were purchased from local supermarkets (João Pessoa, Paraíba, Brazil) within the first 10% of their shelf-life. Each sample comprised approximately 500 g. In market place, the cheese samples were checked for absence of visible signs of alterations and package violation. Cheeses were transported to the laboratory in insulated polystyrene bags containing ice-packs, and used in the experiments within 4 h of transportation. In laboratory, the samples were checked again for absence of off-flavor and excessive slime.

2.2 Physicochemical analyses of cheese

The cheese samples used in assays were analyzed for moisture, fat in dry matter and sodium chloride (salt) contents, as well as for a_w , pH and titratable acidity (lactic acid equivalent). The cheeses were sampled for analyses by removing the rind and cutting a thin slice through the innermost, the intermediate and the outer portions. This material was aseptically macerated, pooled and analyzed for the above mentioned physicochemical parameters following standard procedures (AOAC, 2012).

2.3 Bacterial strains and inoculum preparation

Two strains of *L. monocytogenes* (ATCC 7644, ATCC 19115) and *S. aureus* (ATCC 19095, ATCC 13565), gently supplied by Collection of Reference Microorganisms, National Institute for Control Quality in Health, Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil), were used as test organisms. These typed-culture strains were isolated from clinical (ATCC 19095, ATCC 13565) and nonclinical (ATCC 7644, ATCC 19115) sources and have been widely used in a variety of scientific applications. The test

strains were provided freeze-dried, and they were activated by two-followed 24 h-passages in Muller-Hinton broth (MHB; HiMedia, Mumbai, India) at 30 °C and 37 °C for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. Stock cultures were maintained in MHB containing glycerol (15 g/100mL) at – 20 °C. The strains were adapted to antibiotic to selectively enumerate them in the presence of background microflora in cheese by plating on agar supplemented with the same antibiotic used in adaptation procedure (Samelis et al., 2003; Lekkas et al., 2006). The nalidixic acid-resistant derivative *L. monocytogenes* ATCC 7644 (LM-ATCC 7644NA+) and nalidixic acid-resistant derivative *L. monocytogenes* ATCC 19115 (LM-ATCC 19115NA+) cultures were obtained by consecutive 24h-passages (30 °C) in MHB with increasing concentrations of nalidixic acid until the strains were resistant to 50 µg/mL of the antibiotic. The rifampicin-resistant derivative *S. aureus* ATCC 19095 (SA-ATCC 1905Rif+) and streptomycin-resistant derivative *S. aureus* ATCC 13565 (SA-ATCC 13656Str+) cultures were obtained by consecutive 24-h passages in MHB (37 °C) with increasing concentrations of rifampicin and streptomycin, respectively, until the strains were resistant to 1 µg/mL of rifampicin or to 40 µg/mL of streptomycin. Experiments of survival and growth of the obtained derived-resistant strains in MHB and in coalho cheese confirmed the stability of the induced resistance to each antibiotic and a similar growth behavior to that presented by respective parental strain. Stock derived resistant-strains were kept in MHB containing antibiotic and glycerol (15 g/100mL) at - 20 °C, and working cultures were maintained in MHB containing antibiotic at 4 °C, and transferred monthly.

Before use in experiments, LM-ATCC 11303NA+, LM-ATCC 19115NA+, SA-ATCC 1905Rif+ and SA-ATCC 13656Str+ were cultivated twice in MHB containing 50 µg/mL of nalidixic acid, 1 µg/mL of rifampicin or 40 µg/mL of streptomycin, respectively, at 30 °C or 37 °C for 18 – 20 h. After that, the cultures were harvested through centrifugation (4500

g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and re-suspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions presenting OD reading at 625 nm (OD_{625}) of 0.1. These suspensions provided viable counts of approximately 7 log cfu/mL and 5 lg cfu/mL when pour plated onto Muller Hinton agar (MHA; HiMedia, Mumbai, India). For use in assays of bacterial survival/growth in cheese, these suspensions were diluted (10^{-1}) and (10^{-3}) the suspension in sterile saline solution to provide viable counts of approximately 5 log cfu/mL and 3 log cfu/mL, respectively.

2.4 Preparation of coalho cheese samples, inoculation treatment and bacterial counting

The cheese samples were aseptically removed from commercial packages, cut in slices of 25 g (approximately 3.8 cm width, 5.5 cm length, and 1.1 cm height) on a sterile cutting glass tray using a flamed-sterilized stainless steel knife, all in a biosafety cabinet. After that, 10 μ L-aliquots of the test resistant-derivative *L. monocytogenes* or *S. aureus* strain suspensions used to provide the high (suspensions 7 log cfu/mL) or low inoculum level (suspensions 5 log cfu/mL) were dispensed homogeneously in ten different points onto the surface of the cheese sample slices, which was previously equilibrated during 4 h to the appropriate incubation temperature. A total volume of 100 μ L of the bacterial suspensions was inoculated in each cheese slice, comprising an initial contamination dose of approximately 5 and 3 log cfu/g. A 3-log cfu/g inoculum was used to represent post-processing contamination at probably the highest level expected in practice during the cheese processing (Lekkas et al., 2006); the 5-log cfu/g initial inoculum was used to evaluate if the bacterial growth is affected by the dose of contamination in cheese.

After inoculation, the cheese samples were kept in a biosafety cabinet for 30 min to absorb completely the bacterial suspensions, and placed in sterile propylene bags (volume 400 mL) that were hermetically closed and stored at 7.5 ± 0.5 °C or at 12 ± 0.5

°C. A field study performed to determine the temperatures of coalho cheese samples (n: 100) in retailers (João Pessoa, Brazil) found temperatures ranging from 7.8 - 13.8 °C (unpublished data). For this study, the storage temperature of 7.5 °C was selected to represent a value close to the lowest detected temperature in coalho cheese samples in retailers, and 12 °C was selected to represent the highest storage temperature allowed by current legislation for this product (Brazil, 1997).

At different storage time intervals (0 h – immediately after inoculation, 1h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 d, 2 d; and 3 d, 5 d, 7 d, 14 d and 21d) the enumeration of the inoculated resistant-derivative strain in contaminated cheese samples was made by suspension (1:9) of the respective sample in 225 mL-sterile peptone water (0.1 g/100 mL) and homogenization using a stomacher (Model A440, Marconi Equip. Lab. Ltda., Piracicaba, Brazil) during 3 min at room temperature. Subsequently, serial dilutions (10^{-2} – 10^{-7}) were performed using the same diluent, and 100 µL-aliquots from each dilution were spread plated onto MHA containing 50 µg/mL of nalidixic acid for LM-ATCC 7644NA+ and LM ATCC 19115NA+, and onto MHA containing 1 µg/mL of rifampicin or 40 µg/mL of streptomycin for SA-ATCC 19095Rif+ and SA-ATCC 13565Str+, respectively, followed for incubation at 30 °C or 37 °C during 24 - 48 h, respectively. After the incubation period, the viable cells were counted, and the results were expressed as the log cfu/g. Non-inoculated cheese samples were tested similarly.

During the storage period (0 h – immediately after inoculation, 1, 7 and 14 d), the cheese samples were assessed for pH, titratable acidity (equivalent lactic acid), moisture, fat in dry matter and salt content using the same standard procedure cited above (item 2.2). The 14-day storage time was selected because coalho cheese is commonly sold in market place within 21 days after manufacturing.

2.5 Statistical analysis and reproducibility

The experiments were carried out in two replicates in different occasions, with three cheese samples evaluated in each replicate, in a randomized block design with a factorial scheme (strain of each bacteria x inoculum dose x storage temperature). Difference among the counts of the tested strains and among the values of physicochemical parameters in cheese samples inoculated with different contamination doses and stored at different temperatures were evaluated using analysis of variance (ANOVA) followed for Tukey's post-hoc test. Results were considered significant with $p \leq 0.05$. For this, the computational software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Inc., California, USA) was used.

3. Results and discussion

The average values of physicochemical parameters in coalho cheese samples used in this study are shown in Table 1. The Brazilian standard determines that coalho cheese should be in a range of 36 – 54.9% and 25 – 60% for moisture and fat in dry matter, respectively (Brazil, 1997). The results indicate that coalho cheese samples used in this study complied with the current standard for this product. The average values of a_w and pH of 0.96 and 6.55, respectively, are typical of fresh and minimally ripened cheese. The salting of coalho cheese is allowed, but there is no standard for salt content in final product. The average salt content verified in coalho cheese samples is favorable for survival of *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Sutherland et al., 1994; Pinto et al., 2010).

As a minimally ripened cheese, coalho cheese should be produced using heat-treated milk. Indeed, pasteurized milk has been commonly used by manufacturers to attend this recommendation (Feitosa et al., 2003; Evêncio-Luz et al., 2012). The heat treatments used in milk pasteurization are normally effective to inactivate cells of *L.*

monocytogenes and *S. aureus* (Ortolani et al., 2010). Heating of the curd (45 – 55 °C; Brazil, 1997) may also constitute important step to inactivate cells of these pathogens during coalho cheese manufacture. However, post-heating contamination of the milk or the curd with *L. monocytogenes* and *S. aureus* should be of concern. The risks imposed by this contamination increase because coalho cheese is kept for up to 10 days under abusive temperatures (10 – 12 °C) to undergo a natural slight acidification. After manufacture, coalho cheese may be contaminated with *L. monocytogenes* and *S. aureus* during handling, packaging and storage. This study assessed the survival and growth of two derivative-resistant strains of *L. monocytogenes* (LM-ATCC 1915NA+, LM-ATCC 7644NA+) and *S. aureus* (SA-ATCC 13656Str+, SA-ATCC 1905Rif+) at contamination doses of 3 and 5 log cfu/g in coalho cheese when stored at 7.5 °C or 12 °C during 14 days.

The obtained results showed that the populations of all tested strains were increased ($p \leq 0.05$) by the end of the assessed storage period at both 7.5 and 12 °C (Fig. 1 and Fig. 2). These increases were always > 0.5 and > 1 log cfu/g for both *L. monocytogenes* and *S. aureus* under 7.5 and 12 °C, respectively. In challenge tests, increases in populations > 0.5 log cfu/g (Koutsoumanis and Sofos, 2005; Skandamis et al., 2009) or > 1 log cfu/g (NACMCF challenge document, 2010) indicate a food as favorable substrate to bacterial growth. *L. monocytogenes* and *S. aureus* were not detected in non-inoculated control cheese samples over time.

At any of the assessed storage time points at 7.5 or 12 °C, the counts of *L. monocytogenes* and *S. aureus* were lower than those from initial counts (time zero), and the increases in bacterial populations began already within the first day of storage. Overall, the populations of both pathogens increased earlier in cheese samples stored at 12 °C. The tested strains of *L. monocytogenes* and *S. aureus* presented similar growth

behavior over time despite of the contamination dose. The increases in counts of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese over 14-days storage at 3 and 5 log cfu/g initial dose are noteworthy because studies have found that the higher the inoculated dose, the higher is the reduction of pathogen populations in cheese types. This behavior was observed for *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 (Rogga et al., 2005; Lekkas et al., 2006) in Galotyri cheese and for *L. innocua* in Minas traditional Serro cheese (Pinto et al., 2009).

The cheese samples were not analyzed on the 21th day of storage at both tested temperatures due to occurrence of visible signs of microbial spoilage, such as excessive slime and whitened spots on surface. Populations of *L. monocytogenes* as high as 3.9 - 6.2 and 4.3 – 6.4 log cfu/g survived on the 14th day of storage at 7.5 and 12 °C, respectively. Similarly, populations of *S. aureus* of 4.1 – 6.0 and 4.2 - 6.4 log cfu/g were verified on the same storage time point under 7.5 and 12 °C, respectively. Despite the high populations of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in contaminated coalho cheese samples, the signs of spoilage were not visible up to the 14th day of storage at either 7.5 or 12 °C. This indicates that high populations of *L. monocytogenes* and *S. aureus* may not impact negatively the consumer acceptance of coalho cheese, which can mean an additional risk to consumers. Populations of *S. aureus* of 5 - 6 log cfu/g in foods produce amounts of enterotoxins (20 – 100 ng) sufficient to cause the staphylococcal intoxication (Schelin et al., 2011; Schmid-Hempel and Frank, 2007), and populations of *L. monocytogenes* of 3 log cfu/g in foods may be sufficient to cause listeriosis (Schimid-Hempel and Frank, 2007).

The average pH and titratable acidity values in coalho cheese samples inoculated with *L. monocytogenes* and *S. aureus* at 3 or 5 log cfu/g during storage under 7.5 and 12 °C are presented in Table 2. For the most cases, the pH and acidity of coalho cheese

inoculated with *L. monocytogenes* and *S. aureus* did not differ ($p > 0.05$) over the assessed storage time points under both tested temperatures. Decreases ($p \leq 0.05$) in pH values when occurred were only on the 7th and/or 14th days of storage. No clear influence of contamination dose on pH and acidity in cheese samples over time was observed. The pH values (6.1 – 6.6) in cheese samples were always within the growth range for *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Ray and Bhunia, 2014). The moisture (41.2 – 40.7%), fatty in dry matter (39.11 – 38.8%) and salt (2.03 – 2.09%) contents did not change ($p > 0.05$) in inoculated cheese samples during storage at 7.5 and 12 °C (data not shown). The slight changes in physicochemical parameters during storage could be attributed to the short assessed 14-day storage period. It is known that controlled storage can low moisture, pH and concentrate salt contents causing decreases in survival and growth of certain pathogens in cheese types (Hanifian and Khani et al., 2012; Adouard et al., 2016).

Considering that changes in pH, acidity and salt content were minor and the dose of test pathogens did not influence their growth behavior, one possible main controlling factor on the increases in populations of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese could be the storage temperature. These findings also suggest that the action of the background microflora and starter cultures that produce antimicrobial compounds may not be enough to avoid the survival and growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese during storage. However, the heating of curd during coalho cheese manufacture may have inactivated part of the starter lactic acid bacteria that could antagonize against the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in final product. These pathogens are commonly susceptible to the inhibitory effects of lactic acid bacteria used as starters in cheese production (Abee et al., 1995; Vianna et al., 2008). Therefore, coalho cheese manufacturers must have special care to adopt effective hygienic-sanitary

practices to avoid contamination with *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and to improve refrigeration during transportation, storage and market in retail stores because abusive temperatures may cause faster growth of these pathogens.

4. Conclusions

The results of this study indicate that *L. monocytogenes* and *S. aureus* can survive and growth in coalho cheese stored at 7.5 or 12 °C during 14 days. The bacterial growth behavior was not affected by contamination dose and type of tested strain, but the growth was anticipated in cheese samples stored at 12 °C. The contamination of coalho cheese with *L. monocytogenes* and *S. aureus* must be of concern because low storage temperatures determined by current Brazilian legislation are not suitable to prevent their growth in the product. Therefore, good manufacture practices and strict control of storage refrigeration temperature are imperative to avoid contamination and speed the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus* in coalho cheese, decreasing the risks of foodborne disease from the consumption of this product.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brazil for the financial support and for the post-doctoral scholarships awarded to J.M.B. de Sousa.

References

Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28, 169-185.

Adouard, N., Magne, L., Cattenoz, T., Guillemin, H., Folignè, B., Picque, D., Bonnarme, P., 2016. Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract. *Food Microbiology* 53, 30-40.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International., 2012. 19th ed.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61, 1–10.

Bernini, V., Bottari, B., Dalzini, E., Sgarbi, E., Lazzi, C., Neviani E., Gatti, M., 2013. The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-vined cheese rinds during shelf-life. *Food Control* 34, 323-330.

Bille, J., Blanc, D.S., Schmid, H., Baumgartner, A., Siegrist, H., Tritten, M.L., Lienghard, R., Berner, D., Anderau, R., Trboux, M., Ducommun, J.M., Malinverni, R., Genne, D., Erard, P., Waespi, U., 2006. Outbreak of human listeriosis associated with Tomme cheese in northwest Switzerland. *Euro Surveillance*, 11, 91-93.

Brazil, 1997. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Ordinance No. 352 of 1997: approves technical regulation for the identity and quality of “coalho” cheese. Brasília, DF, Brazil: Diário Oficial da União. (in Portuguese)

de Azevêdo, M. C., dos Santos, G. B., Zocche, F., Horta, M. I. C., Dias, F. S., da Costa, M. M., 2014. Microbiological evaluation of raw milk and coalho cheese commercialised in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. *African Journal of Microbiology Research* 8, 222–229. (in Portuguese)

de Carvalho, R.J., de Souza, G.T., Honório, V.G., de Sousa, J.P., da Conceição, M.L., Magnani, M., de Souza, E.L., 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology* 52, 59-65.

- de Souza, G.T., de Carvalho, R.J., de Souza, J.P., Tavares, J.F., Schaffner, D., de Souza, E.L., Magnani, M., 2016. Effects of the essential oil from *Origanum vulgare* L. on survival of pathogenic bacteria and starter lactic acid bacteria in semihard cheese broth and slurry. *Journal of Food Protection* 79, 246-252.
- Evêncio-Luz, L., Lima-Filho, J.V., Evêncio-Neto, J., 2012. Occurrence of *Salmonella* spp. and coagulase-positive staphylococci in raw eggs and coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's northeast. *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 1463-1466.
- Feitosa, M.T., Borges, M.F., Nassu, R.T., de Azevedo, E.H.F., Muniz, C.R., 2003. Survey of *Salmonella* sp., *Listeria* sp. and hygienic-sanitary indicator microorganisms in cheese manufactured in the state of Rio Grande do Norte. *Food Science and Technology* 23, 162-16. (In Portuguese)
- Hanifian, S., Khani, S., 2012. Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156, 141-146.
- Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 142–148.
- Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M.C., Robert, L., Hummerjohann, J., Stephan, R., 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science* 5, 2944-2948.
- Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 104, 83-91.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research* 2, 63–76.

- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutisnas, L.P., Kontominas, M., Samelis, J., 2006. Survival of *Escherichia coli* O157H:7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. *Food Microbiology* 23, 268-276.
- Luz, I.S., 2009. Molecular characterization of toxins in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and “coalho” cheese in cities from the Agreste region of Pernambuco. *Journal of the São Paulo Tropical Medicine Institute* 51, 140.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. . *International Journal of Food Microbiology* 177, 136–154.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *Journal of Food Protection* 1, 140-202.
- Ortolani, M.B., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Viçosa, G.N., Nero, L.A., 2010. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 175-180.
- Ostyn, A., De Buyser, M.L., Guillier, F., Groult, J., Félix, B., Salah, S., Delmas, G., Hennekinne, J.A., 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveillance* 15. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19528>
- Pintado, C.M.B.S., Oliveira, A., Pampulha, M.E., Ferreira, M.A.S.S., 2005. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology* 22, 79-85.

- Pinto, M.S., de Carvalho, A.F., Pires, A.C.S., de Paula, J.C.J., Sobral, D., Magalhães, F.A.R., 2009. Survival of *Listeria monocytogenes* in Minas Traditional Serro cheese during ripening. *Food Control* 20, 1167-1170.
- Ray, B., Bhunia, A., 2014. *Fundamentals of Food Microbiology*. 5th Ed. CRC Press, Boca Raton. 577pp.
- Rogga, K.J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M., Savva, I.N., Kontominas, M.G., 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4 °C and 12 °C. *International Dairy Journal* 15, 59-67.
- Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylvén, S., Lindqvist, R., 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 144, 263-269.
- Sabioni, J.G., Hirooka, E.Y., Souza, M.L.R., 1988. Foodborne intoxication by *Staphylococcus aureus* contaminated Minas cheese. *Revista de Saúde Pública* 22, 458-461. (In Portuguese)
- Samelis, J., Ikeda, J. S., Sofos, J. N., 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Applied Microbiology* 95, 563-575.
- Santana, R.F., Santos, D.M., Martinez, A.C.C., Lima, A.S., 2008. Microbial quality of coalho cheese marketed in Aracajú, SE. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science* 60, 1517-1522. (In Portuguese)
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M.T., Lindqvist, R., Barker, G.C., Radstrom, P., 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2, 580-592.

Schmid-Hempel, P., Frank, S.A., 2007. Pathogenesis, virulence, and infective dose.

PLoS Pathogens 3, e147.

Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F., Jordan, K., 2011. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurized or raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 145, 531-538.

Silva, E.N.G., Figueiredo, A.C.L., Miranda, F.A., Almeida, R.C.C., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheese by bacteriophage P100. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 11-16, 2014.

Silva, R.A., Bismara, P.A., Moura, R.B., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H., 2012. Evaluation of the bacterial microbiota of artisanal coalho cheese manufactured in Agreste region of the state of Pernambuco. *Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science* 64, 1732-1738. (In Portuguese)

Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., Sofos, J.N., 2007. Modelling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/non growth interface of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 120, 237-249.

Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., Roberts, T.A., 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21, 217-236.

Tiwari, U., Walsh, D., Rivas, L., Jodan, K., Duffy, G., 2014. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behavior of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. *Food Control* 42, 248-256.

- Valero, A., Hernandez, M., De Cesare, A., Manfreda, G., Gonzalez-Garcia, P., Rodriguez-Lázaro, D., 2014. Survival kinetics of *Listeria monocytogenes* on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 184, 39-44.
- Vianna, P.C., Mazal, G., Santos, M.V., Bolini, H.M., Gigante, M.L., 2008. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. *Journal of Dairy Science* 91, 1743-1750.

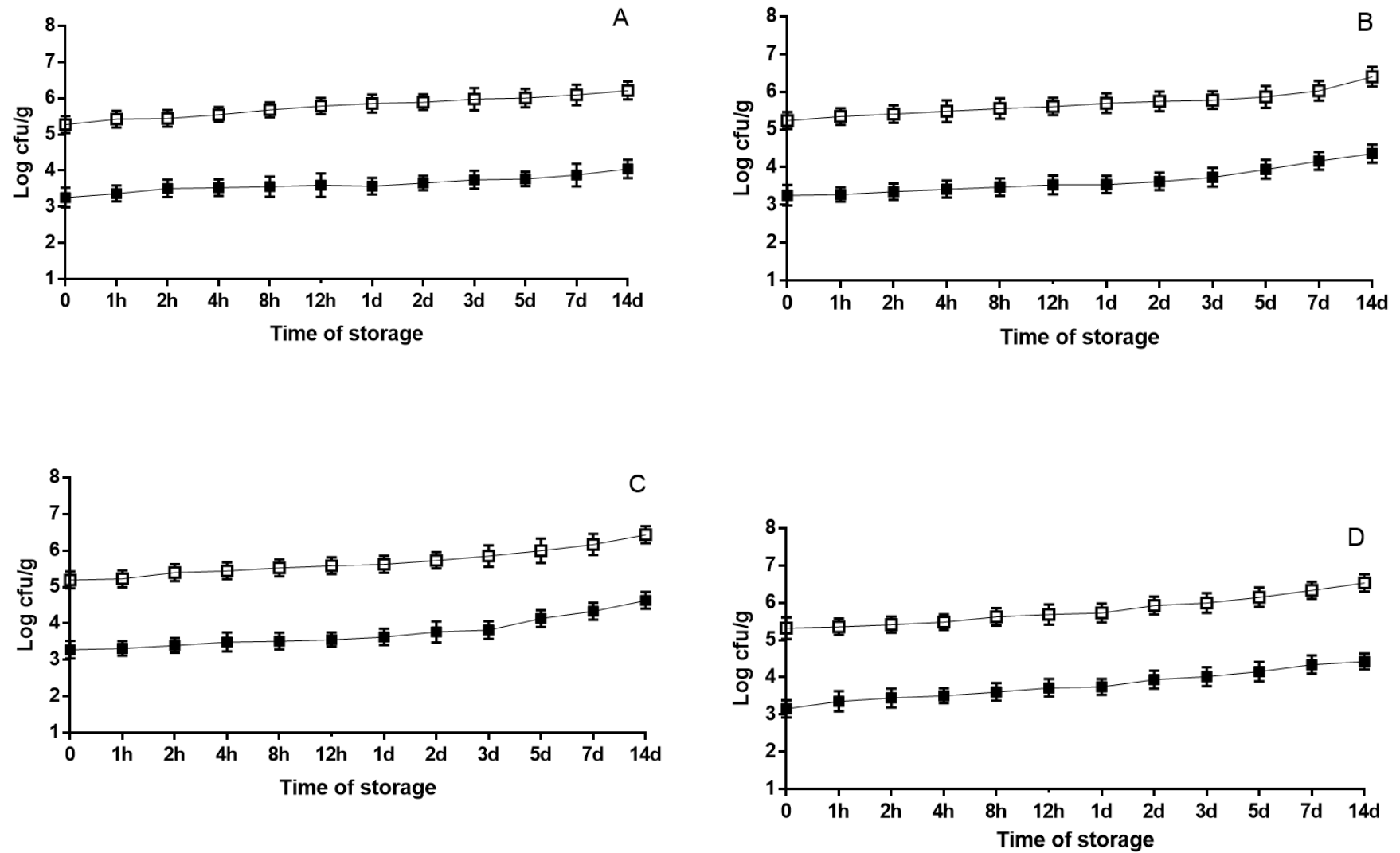


Fig. 1. Survival and growth of *L. monocytogenes* in coalho cheese during storage at 7.5 °C and 12 °C for 14 days. (■): 3 log cfu/g; (□): 5 log cfu/g. A: LM-ATCC 19115NA+ at 7.5 °C; B: LM-ATCC 7644NA+ at 7.5 °C; C: LM-ATCC 19115NA+ at 12 °C; D: LM-ATCC 7644NA+ at 12 °C.

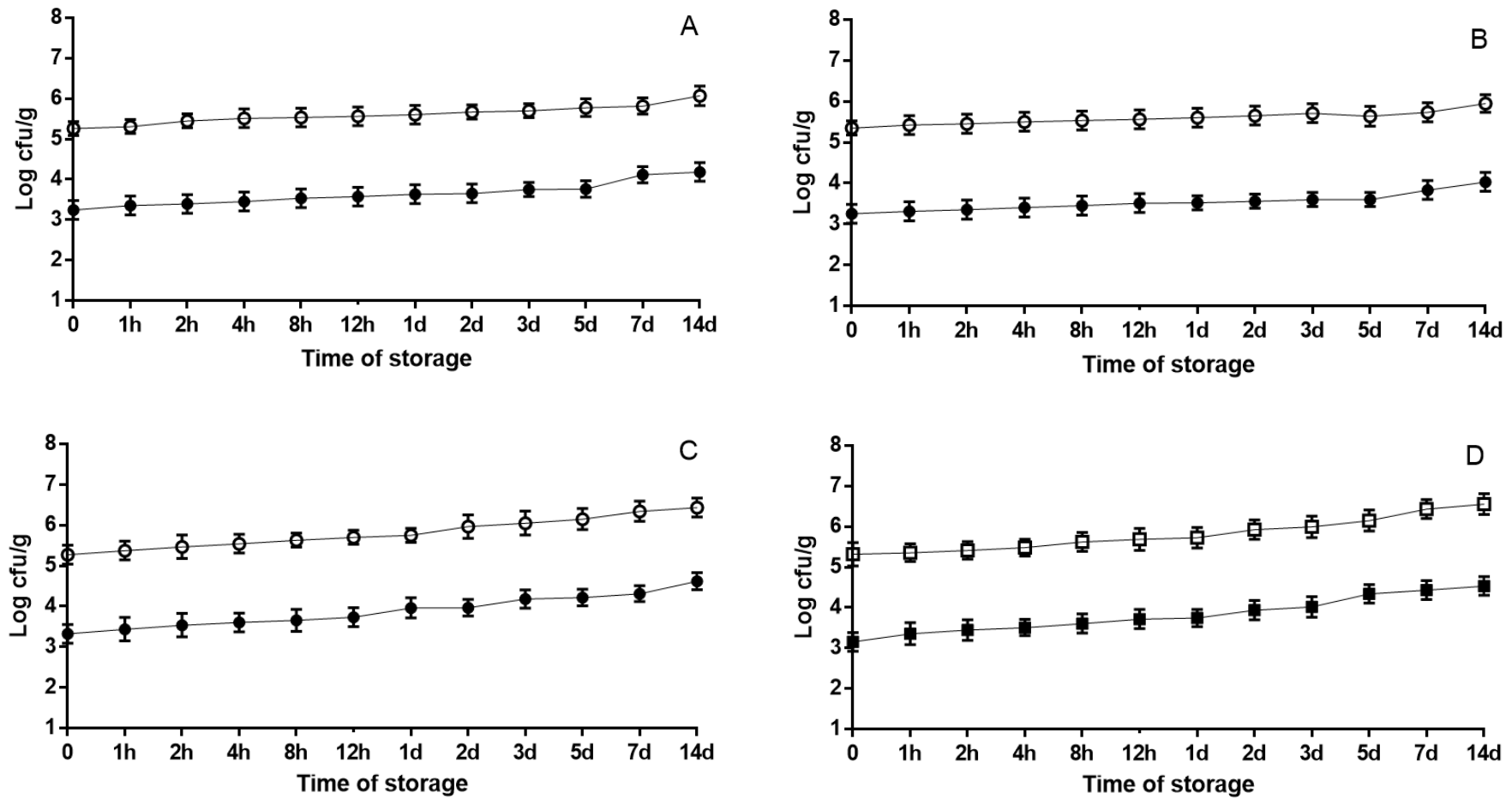


Fig. 2. Survival of *S. aureus* in coalho cheese during storage at 7.5 °C and 12 °C for 14 days. (●): 3 log cfu/g; (○): 5 log cfu/g. A: SA-ATCC 13565Str+ at 7.5 °C; B: SA-ATCC 19095Rif+ at 7.5 °C; C: SA-ATCC 13565Str+ at 12 °C; D: SA-ATCC 19095Rif+ at 12 °C.

Table 1. Physicochemical characteristics (average, $\pm$ standard deviation) of coalho cheese samples used in assays.

Parameters	Values
Moisture (g/100 g)	40.7 $\pm$ 0.24
Fat in dry matter (g/100 g)	39.16 $\pm$ 1.09
Sodium chloride (g/100 g)	2.01 $\pm$ 0.16
a_w	0.96 $\pm$ 0.23
Ph	6.42 $\pm$ 0.26
Titrateable acidity (g lactic acid/100 g)	0.22 $\pm$ 0.01

Table 2. Values (average, $\pm$ standard deviation) of pH and titratable acidity (g lactic acid/100g) in coalho cheese samples inoculated with *S. aureus* at different doses (3 and 5 log cfu/g), during 14 days of storage at 7.5 °C and 12 °C.

Strains	Time of storage		1 st day		7 th day		14 th day	
	Day zero*							
	pH	Titratable acidity	pH	Titratable acidity	pH	Titratable acidity	pH	Titratable acidity
Storage at 7.5 °C								
LM-ATCC 19115NA+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.2 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	6.3 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ba}
LM-ATCC 19115NA+ (5 log cfu/g)	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
LM-ATCC 7644NA+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{Aab}	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.3 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	0.3 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.2 ^{Ab}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
LM-ATCC 7644NA+ (5 log cfu/g)	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
SA-ATCC 13565Str+ (3 log cfu/g)	6.3 $\pm$ 0.2 ^{Ab}	0.3 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.2 ^{Ab}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{ABab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.0 ^{Ba}
SA-ATCC 13565Str+ (5 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.2 ^{Bb}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	0.3 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Ba}
SA-ATCC 19095Rif+ (3 log cfu/g)	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.0 ^{Ab}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
SA-ATCC 19095Rif+ (5 log cfu/g)	6.0 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.0 ^{Ab}	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.1 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
Control **								
Storage at 12 °C								
LM-ATCC 19115NA+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.3 $\pm$ 0.0 ^{Aa}
LM-ATCC 19115NA+ (5 log cfu/g)	6.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.3 $\pm$ 0.3 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
LM-ATCC 7644NA+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.2 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	0.5 $\pm$ 0.0 ^{Ba}	6.4 $\pm$ 0.2 ^{Aa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{ABa}
LM-ATCC 7644NA+ (5 log cfu/g)	6.4 $\pm$ 0.2 ^{ABa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{ABb}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{ABa}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.7 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	6.1 $\pm$ 0.2 ^{Ba}	0.7 $\pm$ 0.1 ^{Bb}
SA-ATCC 13565Str+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	0.3 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.5 $\pm$ 0.1 ^{ABb}	0.8 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{ABb}	0.7 $\pm$ 0.1 ^{Ba}
SA-ATCC 13565Str+ (5 log cfu/g)	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.0 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.1 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Aa}
SA-ATCC 19095Rif+ (3 log cfu/g)	6.5 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	0.4 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.6 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	0.3 $\pm$ 0.0 ^{Aa}	6.3 $\pm$ 0.1 ^{Aab}	0.6 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Bb}	0.7 $\pm$ 0.1 ^{Ba}
SA-ATCC 19095Rif+ (5 log cfu/g)	6.4 $\pm$ 0.2 ^{Ab}	0.5 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	6.4 $\pm$ 0.1 ^{Ab}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{Aab}	6.2 $\pm$ 0.1 ^{Aa}	0.8 $\pm$ 0.1 ^{Ba}	6.5 $\pm$ 0.2 ^{Bb}	0.8 $\pm$ 0.0 ^{Ba}
Control**								

LM-ATCC 19115NA+: derivative strain of *L. monocytogenes* ATCC 19115 resistant to nalidixic acid (50 μ g/mL); LM-ATCC 7644NA+: derivative strain of *L. monocytogenes* ATCC 7644 resistant to nalidixic acid (50 μ g/mL); SA-ATCC 13565Str+: derivative strain resistant of *S. aureus* ATCC 13565 resistant to streptomycin (40 μ g/mL); SA-ATCC 19095Rif+: derivative strains of *S. aureus* ATCC 19095 resistant to rifampicin (1 μ g/mL); * baseline: just after inoculation; **: non-inoculated cheeses, but kept at the same storage conditions. ^{A-B}: different superscript capital letters at the same row, for the assessed parameter, denote difference ($p \leq 0.05$) among values, based on Tukey's test; ^{a-b}: different superscript small letters at the same column denote difference for the same microorganism and storage condition, based on Tukey's test.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que *L. monocytogenes* e *S. aureus* podem sobreviver e se multiplicar em queijo de coalho armazenado a 7,5 ou 12 °C. O comportamento bacteriano não foi afetado pelo nível de inóculo inicial e tipo de cepa bacteriana testada. Entretanto, o aumento da população bacteriana o crescimento foi antecipado nas amostras de queijos armazenadas a 12 °C.

As amostras de queijo contaminadas com *L. monocytogenes* e *S. aureus* e mantidas sob armazenamento a 7,5 ou 12 °C apresentaram discretas alterações nos valores dos parâmetros físico-químicos avaliados ao longo do período de 14 dias de armazenamento. As amostras de queijo contaminadas não apresentaram sinais visíveis de deterioração até o 14º dia de armazenamento, o que pode representar um aumentado risco à saúde dos consumidores.

A contaminação do queijo de coalho com *L. monocytogenes* e *S. aureus* deve ser motivo de preocupação, visto que as temperaturas de armazenamento determinadas pela legislação brasileira em vigor não são adequados para impedir o crescimento destes patógenos no produto. Portanto, as boas práticas de fabricação e controle rigoroso de temperatura de armazenamento sob refrigeração são fundamentais para evitar a contaminação e acelerar o crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em queijo de coalho, diminuindo os riscos de doenças transmitidas por alimentos em decorrência da ingestão deste produto.

Considerando o amplo consumo de queijo de coalho na região Nordeste do Brasil, e os frequentes resultados de estudos que mostram contaminação por diversos agentes patogênicos, justifica-se a necessidade de realização de testes desafio, com a finalidade de obtenção de dados que revelem a capacidade de diferentes patógenos em sobreviver, multiplicar e persistir no produto ao longo do armazenamento, de forma a subsidiar o estabelecimento de medidas que venham aumentar a vida de prateleira e diminuir o potencial risco aos consumidores.