

MILIMANI ANDRETTA

**SERRO ARTISANAL CHEESE PRODUCED IN BRAZIL HAS A MICROBIAL
SAFETY STATUS FOR CONSUMERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A561s
2019
Andretta, Milimani, 1992-
Serro artisanal cheese produced in Brazil has a microbial
safety status for consumers / Milimani Andretta. – Viçosa, MG,
2019.
ix, 36 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luís Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Zoonoses. 2. Controle de qualidade. 3. Queijo -
Microbiologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.089456

MILIMANI ANDRETTA

**SERRO ARTISANAL CHEESE PRODUCED IN BRAZIL HAS A MICROBIAL
SAFETY STATUS FOR CONSUMERS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

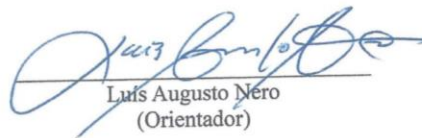
APROVADA: 21 de fevereiro de 2019.



Antônio Fernandes de Carvalho



Luciano dos Santos Bersot



Luis Augusto Nero
(Orientador)

À minha família, Inês, Senir, Magdiel e
Isabelle Andretta

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Inês e Senir Andretta, meu irmão Magdiel e minha sobrinha Isabelle pelo apoio, consolo, carinho, amizade, convivência (inclusive virtual) e por serem os principais responsáveis pela pessoa que me tornei, amo vocês!

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente aqueles que chegaram e por aqui ficaram. Aos que se fazem presentes, mesmo distantes, e àqueles que convivem diariamente comigo.

Um agradecimento especial à minha amiga Frida, que por compartilhar comigo todos os costumes e culturas da nossa amada região Sul do Brasil, acabou se tornando uma irmã e tudo o que um irmão representa na nossa vida.

Agradeço a Rafa, que além de ser minha amiga, companheira de laboratório, também divide comigo nossa casinha, a república “RioGranduco”, obrigada por ser a melhor companheira que eu poderia ter, e que sigamos com a nossa república por muitos anos!

Não posso deixar de agradecer aos meus companheiros de laboratório, a família InsPOA e agregados, que mais do que colegas de trabalho, acabaram se tornando amigos da vida! Obrigada por toda a ajuda, suporte, companheirismo para superar as dificuldades, obrigada por me escutarem e desculpa qualquer coisa!

Agradeço às meninas Thaíza e Letícia e todos os estagiários que me ajudaram e vieram para somar nesse projeto.

Agradeço ao Anderson, pela contribuição nessa dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi por todas às vezes pela qual me ajudou e ao Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho pelo apoio e fornecimento dos queijos.

Um muito obrigada ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Augusto Nero, pelo exemplo, conhecimentos transmitidos, disponibilidade, paciência e principalmente por confiar em mim.

Agradeço também aos técnicos do DVT, principalmente ao Dagô, seu Luiz e Alex.

Finalmente, agradeço ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Queijo Minas Artesanal.....	3
2.2. Perigos microbiológicos em queijos artesanais.....	4
2.3. Monitoramento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em produtos de origem animal	6
2.4. Referências Bibliográficas	9
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo Geral	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. SCIENTIFIC ARTICLE - Serro Artisanal Cheese Produced in Brazil has a Microbial Safety Status for Consumers	14
Title page.....	15
ABSTRACT	16
INTRODUCTION.....	17
MATERIAL AND METHODS	19
<i>Samples and dilutions</i>	19
<i>Listeria monocytogenes</i>	19
<i>Salmonella spp.</i>	19
<i>Staphylococcus spp.</i>	20
<i>Staphylococcus enterotoxins</i>	21
<i>Data analysis</i>	21
RESULTS AND DISCUSSION	24
CONCLUSIONS	30
Acknowledgments	30

References	30
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Mapa das sete regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais: Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá e Triângulo.

Fonte: Portal do queijo, disponível em:
<https://portaldoqueijo.com.br/noticias/2017/07/11/>4

LISTA DE TABELAS

SCIENTIFIC ARTICLE

Table 1: Oligonucleotides used for identification of <i>S. aureus</i> , staphylococcal enterotoxins (EE), confirmation of <i>Listeria</i> in genus and species, both by polymerase chain reaction (PCR).	23
Table 2: Relationship of counts between the culture medium (Petrifilm™ Staph Express (STX) and Baird Parker and the morphologies searched, in addition to grouping according to the counting averages.	25
Table 3: Frequencies of isolates characterized morphologically, according to the culture medium and with their morphological characteristics.	27
Table 4: Number of samples that presented <i>Staphylococcus</i> counts within their respective ranges obtained by Baird Parker and Petrifilm™ STX (CFU/g).	28

RESUMO

ANDRETTA, Milimani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Queijo artesanal do Serro produzido no Brasil tem segurança microbiológica para consumidores.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Queijo Minas Artesanal tem importância socioeconômica, histórica e cultural, sendo fabricado a partir de técnicas transmitidas de geração em geração e denominado de acordo com sua região de origem, como Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá e Triângulo. Por serem amplamente manipulados, estão sujeitos à contaminação microbiológica durante a fabricação. Este produto possui uma legislação específica, que regula a produção, inspeção e venda a varejo. A pesquisa bacteriológica é essencial na produção de alimentos seguros, uma vez que muitas vezes permite entender as condições higiênicas da produção. O objetivo do presente estudo foi avaliar a segurança microbiológica de queijos artesanais produzidos na região do Serro, Minas Gerais, Brasil, avaliando o desempenho do Petrifilm™ STX para enumeração de *Staphylococcus* spp. Um total de 53 amostras de queijo artesanal de Serro foram coletadas e submetidas à pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e enumeração de *Staphylococcus* spp. As amostras de queijos e isolados de *Staphylococcus* obtidos foram submetidos a PCR para pesquisas genes relacionados às enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e ELISA para detectar a presença dessas enterotoxinas. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. As contagens foram variáveis para *Staphylococcus* spp., dependendo do protocolo de enumeração adotado, mas de maneira geral, elas foram significativamente maiores com Baird-Parker quando comparados ao Petrifilm™ STX ($p < 0.05$). Nenhuma das amostras apresentou resultado positivo para a presença de enterotoxinas, e não apresentou amplificação de produtos de PCR para as enterotoxinas clássicas. Os isolados de *S. aureus* também não apresentaram os genes relacionados às enterotoxinas estafilocócicas. Os resultados indicaram condições higiênicas deficientes na produção de queijo, devido às altas frequências de amostras que apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superiores ao permitido pela legislação. No entanto, um *status* de segurança microbiológica das amostras foi registrado devido à ausência de patógenos e toxinas comuns de origem alimentar frequentemente envolvidos em riscos associados a queijos produzidos com leite cru.

ABSTRACT

ANDRETTA, Milimani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Serro Artisanal Cheese produced in Brazil has a Microbial Safety status for consumers.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Ricardo Seiti Yamatogi.

Artisanal Minas cheese has socioeconomic, historical and cultural importance, being produced with techniques transmitted from generation to generation. It is named according to their region of origin, such as Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá and Triângulo. The cheeses are extensively handled and subjected to microbiological contamination during production. This product has specific legislation, which regulates the production, inspection and retail sale. Bacteriological research is essential in the production of safe food, since it often allows to understand the hygienic conditions of production. The objective of the present study was to evaluate the microbiological safety of artisanal cheeses produced in the region of Serro, Minas Gerais, Brazil, evaluating the performance of Petrifilm™ STX for enumeration of *Staphylococcus* spp. A total of 53 samples of artisanal cheese from Serro were collected and subjected to the research of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. and enumeration of *Staphylococcus* spp. Artisanal cheese samples and the obtained *Staphylococcus* isolates were submitted to PCR to search for genes related to classical staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED and SEE) and ELISA to detect the presence and production of these enterotoxins. None sample presented positive results for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. *Staphylococcus* spp. counts were variable, depending on the enumeration protocol adopted, but in general, counts were significantly higher with Baird-Parker when compared to Petrifilm™ STX ($p < 0.05$). None of the samples presented a positive result for the presence of enterotoxins, nor amplification of PCR products for the classic enterotoxins. *S. aureus* isolates did not produced staphylococcal enterotoxin nor presented the enterotoxin-related genes. The results indicated poor hygienic conditions in the production of cheese, due to the high frequencies of samples that presented coagulase positive *Staphylococcus* counts higher than the limits allowed by the current legislation. However, a safety status of the samples was recorded due to the absence of common foodborne pathogens and toxins, often described as common hazards associated with cheeses made from raw milk.

1. INTRODUÇÃO

O queijo possui fatores intrínsecos e extrínsecos que permitem a multiplicação de micro-organismos. Diversos grupos de micro-organismos podem estar presentes em queijos: os desejáveis, como bactérias láticas, conferem características sensoriais aos produtos; porém, patógenos podem contaminar esses produtos em diferentes etapas da cadeia produtiva e causar efeitos adversos à saúde dos consumidores. Dentro deste último grupo, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e toxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. estão frequentemente associados com toxi-infecções associadas ao consumo de alimentos contaminados.

A intoxicação estafilocócica tem sido relacionada ao consumo de queijos artesanais contaminados produzidos com leite cru. Nos Estados Unidos, *S. aureus* está ranqueado como quinto patógeno com maior incidência em surtos (CDC 2015). Na Europa, o grupo das toxinas (toxinas estafilocócicas, juntamente com toxinas produzidas por *Bacillus* e *Clostridium*) é o segundo maior causador de surtos associados ao consumo de alimentos contaminados (EFSA, 2017).

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017), 70,6% dos surtos ocorridos entre 2007 a 2017 são de etiologia desconhecida, e dos surtos causados por bactérias, *S. aureus* foi identificado o terceiro agente etiológico com maior prevalência. Os sintomas que caracterizam a intoxicação são náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia e podem aparecer algumas horas depois da ingestão do alimento contaminado pelas toxinas estafilocócicas.

As principais fontes de contaminação do leite cru são a pele e mucosas dos animais ou manipuladores, equipamentos de ordenha e ambiente leiteiro. Sanidade dos animais e higiene dos manipuladores durante as atividades de ordenha são fundamentais para assegurar a qualidade da matéria prima a ser utilizada para a produção dos queijos,

principalmente queijos artesanais produzidos com leite cru. Atualmente, recomenda-se que as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva sejam menores que $1,0 \times 10^2$ UFC/g em queijo Minas Artesanal. Além disso, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* devem estar ausentes em 25 g do produto.

A presença de *S. aureus* não indica que o queijo Minas Artesanal está impróprio para consumo. No entanto, a identificação desses isolados e caracterização do seu potencial enterotoxigênico é importante para atestar a inocuidade dos produtos comercializados. Por outro lado, a ausência de *S. aureus* no alimento também não garante a inocuidade do mesmo, sendo necessário identificar a presença de enterotoxinas, que podem ter sido produzidas pelo patógeno durante a produção e que permaneceram no alimento.

Considerando as recentes atualizações nas leis que regulamentam a produção, inspeção e comercialização de queijos artesanais no Brasil, o presente estudo teve como objetivo avaliar a inocuidade dos queijos artesanais produzidos na região do Serro, comparar o método oficial de enumeração de *Staphylococcus* spp. com uma metodologia alternativa, e identificar o potencial enterotoxigênico de isolados identificados como *Staphylococcus* spp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Queijo Minas Artesanal

Segundo o decreto 44.864 de 1º de agosto de 2008, que altera a lei 14.185 (MINAS GERAIS, 2008), Queijo Minas Artesanal (QMA) é aquele elaborado a partir do leite cru integral, na propriedade de origem do leite, assentamentos ou grupos de produtores. O QMA deve ser produzido utilizando como ingrediente o pingo (soro-fermentado originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior e utilizado como fermento), coalho, sal, submetido à prensagem manual e maturado entre 17 e 22 dias (EMATER, 2017).

A produção de queijos no Brasil surgiu durante o período colonial (em meados do século XVIII) como principal forma de conservação do leite e preservação dos seus nutrientes. Segundo dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER – MG, 2017), mais de nove mil famílias são responsáveis pela produção de 220 mil toneladas de QMA por ano em sete regiões tradicionais do Estado de Minas Gerais (Figura 1). Devido a sua importância cultural e econômica, o QMA foi reconhecido como Patrimônio Histórico de Minas Gerais pelo Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Natural (IPHAN, 2008).

Independente da região, a tecnologia utilizada para a produção de QMA é semelhante, isso porque o objetivo inicial era realizar o mesmo processamento do queijo trazido pelos Portugueses. As diferenças entre as regiões são determinadas pelo fermento endógeno, condições geográficas, clima e pastagem, entre outros fatores. A utilização do “pingo” se estabeleceu devido à necessidade de conservar o fermento, uma vez que as propriedades eram de difícil acesso (BRUMANO, 2016). Assim como em outras regiões, o queijo também chegou com a “trilha do Ouro” na região do Serro,

porém, foi apenas em meados do século XIX, com a abertura da estrada de rodagem Serro – Belo Horizonte, que o queijo do Serro se consolidou, propiciando a comercialização para todo o Estado de MG (PIRES et al., 2013). Além de ser considerado Patrimônio Histórico Imaterial pelo IPHAN, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2011) concedeu a 11 municípios da região do Serro o título de Indicação Geográfica (IG), como forma de reconhecimento por serem referência na Fabricação de Queijo Artesanal tipo Serro, valorizando ainda mais o produto da região (BRUMANO, 2016).



Figura 1: Mapa das sete regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais: Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá e Triângulo. Fonte: Portal do queijo, disponível em: <https://portaldoqueijo.com.br/noticias/2017/07/11/>

2.2. Perigos microbiológicos em queijos artesanais

Queijos artesanais tem importância socioeconômica, histórica e cultural, sendo fabricados a partir de técnicas transmitidas de geração em geração. Por serem amplamente manipulados, os queijos artesanais estão sujeitos à contaminação microbiológica durante a fabricação, e oferecem condições adequadas para a

multiplicação de uma variedade micro-organismos, principalmente quando produzidos com leite cru (PINTO et al., 2008). Altas contagens bacterianas podem influenciar na qualidade dos queijos artesanais e no tempo de prateleira do mesmo (PORCELLATO et al., 2018).

Falhas nas boas práticas de fabricação (BPF) ou a presença de patógenos na matéria-prima são um risco para a saúde dos consumidores, uma vez que a ingestão de queijos contaminados pode resultar em casos e surtos de toxinfecções alimentares (LAW; TAMIME, 2011). Diversos patógenos podem contaminar os queijos artesanais: *Bacillus cereus*, *Campylobacter coli* e *C. jejuni*, *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* produtor de verotoxina (VTEC), *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* (CLAEYS et al., 2013).

S. aureus é uma bactéria de natureza ubíqua, que pode estar presente na pele e mucosas de animais e humanos, superfície dos equipamentos leiteiros e ambiente de ordenha. Na planta de produção de queijo a origem da contaminação por *S. aureus* se dá pelos manipuladores, portanto, esse micro-organismo é considerado um bom indicador de boas práticas de manipulação (BASANISI et al., 2016). As condições intrínsecas do queijo, como pH, a_w e concentrações de NaCl podem favorecer a multiplicação de *S. aureus* (VIANA et al., 2009; BORELLI et al., 2011). Este micro-organismo possui capacidade de produzir enterotoxinas e reconhecida resistência a diversas substâncias antimicrobianas, podendo causar danos à saúde dos animais e humanos (ARGUDÍN et al., 2010; CARFORA et al., 2015).

A produção de enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcus enterotoxins*, SE) é um dos principais mecanismos de virulência de *S. aureus*: essas proteínas são de baixa massa molar, hidrossolúveis, e apresentam estrutura molecular e mecanismos de ação

semelhantes. Pertencem à família de toxinas superantigênicas (SAGs), podendo se ligar com moléculas do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHCII) (ZHANG et al., 2017). Além de serem resistentes às proteases gastrintestinais, como a pepsina e tripsina, são termoestáveis; assim, mesmo que o micro-organismo seja eliminado no processo térmico ou no suco gástrico, a enterotoxina permanece biologicamente viável (ERTAS et al., 2010).

Até o momento foram identificadas 23 diferentes SE, porém 95% dos surtos confirmados são devido às enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) (RAHIMI; ALIAN, 2013). As outras SE ainda não possuem a sua capacidade emética comprovada e por isso são separadas em outros cinco grupos, de acordo com a semelhança da sequência dos aminoácidos: (i) toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1); (ii) novas enterotoxinas (SEG, SEI, SER, SES); (iii) *staphylococcal enterotoxin-like* - SEI - (SEIj, SEIk, SEIl, SEIm, SEIn, SEIo, SEIp, SEIq, SEIU, SEIU₂, SEIV); (iv) SET e; (v) SEH (ARGUDÍN et al., 2010).

2.3. Monitoramento de *Staphylococcus* coagulase positiva em produtos de origem animal

S. aureus é uma bactéria anaeróbia facultativa, se multiplica em pH de 4 a 10, suporta temperaturas que variam de 7 a 48 °C e a_w mínima de 0,83% (BIANCHI et al., 2014). Este micro-organismo faz parte da microbiota humana, e pode estar presente nas mãos ou narinas de manipuladores de alimentos (FERREIRA et al., 2014), de forma que a contaminação do queijo pode ser dar no processamento, devido à manipulação conduzida com falta de higiene (THAKER et al., 2013).

Historicamente, o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* sempre foi associado ao seu potencial patogênico, usualmente caracterizado pela capacidade de

produzir a enzima coagulase (RODRÍGUEZ et al., 2016). Entretanto, vários surtos relacionados a intoxicações por SEs foram caracterizados como sendo ocasionados por cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, levando a estudos mais detalhados que demonstram que a associação entre essas características não é direta (CUNHA et al., 2006; MELLO et al., 2016). Entretanto, vários países ainda utilizam a enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva como referencial de inocuidade para alguns alimentos. No Brasil, o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001), a Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003) recomendam uma concentração de 10^2 UFC/g para contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em alguns produtos lácteos; de acordo com o Decreto 42.645 (MINAS GERAIS, 2002), o leite cru utilizado na fabricação de queijos artesanais deve ter uma concentração máxima de 10^2 UFC/mL. Na União Europeia, a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos produzidos com leite cru deve atender os critérios definidos no seguinte plano de amostragem: $n = 5$, $c = 2$, $m = 10.000$ UFC/g, e $M = 100.000$ UFC/g; quando identificado algum lote que apresente alguma amostra com contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva entre os limites estabelecidos, a pesquisa de SE deve ser realizada para avaliação da inocuidade desse lote (ausência em 25 g) (UNIÃO EUROPEIA, 2005).

Para enumerar *Staphylococcus* spp. em alimentos, usualmente são utilizados métodos microbiológicos convencionais, onde as colônias características são enumeradas após o plaqueamento em meios de cultura seletivos. A *International Organization Standardization* ISO – 6888-1 (ISO, 1999a), a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003), e United States Food and Drug Administration (FDA, 2001) recomendam a utilização de Ágar Baird-Parker (BPA) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio como meio de cultura oficial para a enumeração de *S. aureus*. A

ISO – 6888-2 recomenda *Rabbit Plasma Fibrinogen agar* (RPFA) (ISO, 1999b), que permite a enumeração direta de *Staphylococcus* coagulase positiva. A confirmação é realizada a partir de testes bioquímicos, como coloração de Gram, catalase, coagulase e DNase (VIÇOSA et al., 2010).

Apesar de ser considerado “padrão ouro” e utilizado em diversos países, o método preconizado pela ISO possui algumas desvantagens, como a demanda de tempo e mão de obra para preparo de materiais (TERAMURA et al, 2015). Assim, nas últimas décadas, surgiram meios de cultura e métodos alternativos, com objetivo de compensar as limitações dos métodos convencionais para a enumeração de *S. aureus* em alimentos (Buyser et al., 2003). Métodos mais práticos e simples foram criados, que requerem uma menor demanda de material, tempo e espaço (NERO, et al., 2000). O Sistema Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) é um método alternativo composto por um sistema de filme duplo com nutrientes desidratados e um composto gelificante solúvel em água fria. O ágar Baird-Parker modificado presente no sistema é seletivo para algumas espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, e para confirmar *S. aureus* em todas as colônias suspeitas, utiliza-se um disco Petrifilm Staph Express Disk (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA). Essa metodologia permite a identificação de *Staphylococcus* DNase positiva, e pressupõe que essa característica tenha uma associação direta com a capacidade das cepas em produzir SE.

A detecção de *S. aureus* em alimentos também pode ser realizada através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que permite amplificar as sequências alvo de DNA do micro-organismo. A PCR apresenta diversas vantagens em relação a outras técnicas, é rápida, sensível e específica. No entanto, não é possível de demonstrar efetivamente a presença das enterotoxinas, o que acaba se tornando um fator limitante. Como a presença da bactéria não indica necessariamente a presença de enterotoxinas, criou-se métodos para detecção e quantificação de toxinas. A concentração de SE é um

fator limitante da maioria dos métodos, e o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é o método imunológico mais utilizado (VIÇOSA, 2012). Existem *kits* ELISA para a detecção de SEs em sobrenadantes de culturas e em alimentos, como o queijo. O teste baseia-se na reação dos anticorpos imobilizados na placa com as SE presentes na amostra (WU et al., 2016). Apesar de ser uma ferramenta rápida e de fácil leitura (visual ou por espectrofotometria), os *kits* ELISA disponíveis no mercado permitem apenas a detecção das cinco principais SE (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), podendo esse ser um fator limitante na detecção de surtos (VIÇOSA, 2012). Dessa forma, é necessário verificar concomitantemente a presença do isolado e sua expressão gênica, determinando o potencial que os isolados têm de causar a enfermidade.

2.4. Referências Bibliográficas

ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. *Anvisa*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2001.

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

BASANISI, M. G.; NOBILI, G.; LA BELLA, G.; RUSSO, R.; SPANO, G.; NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Research*, v. 135, p. 17–19, 2016.

BIANCHI, D. M.; GALLINA, S.; BELLIO, A.; CHIESA, F.; CIVERA, T.; DECASTELLI, L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Letters in Applied Microbiology*, v. 58, n. 2, p. 190–196, 2014.

BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDAO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA, C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 481–487, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controles de Produtos de Origem Animal e Água, edição federal, São Paulo, 2003. Disponível em:

<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>, Acesso em 15/01/2019

BRUMANO, É. C. da C. *Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro – MG*, 2016, .f.136, tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. 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.

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

CUNHA, M. L. R. S.; RUGOLO, L. M. S. S.; LOPES, C. A. M. Study of virulence factors in coagula-netative staphylococci isolated form newborns. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 661-668, 2006.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. *Produção de Queijo Minas Artesanal ganha reforço com o atendimento a 600 produtores familiares no estado*. 2017. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite_pagina_interna&id=20360. Acesso em: 15/01/2019

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 74–77, 2010.

UNIÃO EUROPÉIA. Regulamento (CE) n.º 2073-2005. **Jornal Oficial da União Europeia L 338 de 22 de Dezembro de 2005**, p. 1–26, 2005.

FDA. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual: Staphylococcus aureus*, 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>, Acesso em: 15/01/2019.

FERREIRA, J. S.; COSTA, W. L. R.; CERQUEIRA, E. S.; CARVALHO, J. S.; OLIVEIRA, L. C.; ALMEIDA, R. C. C. Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 395–400, 2014.

INPI. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Serro, 2015. disponível em: <http://indicacaogeografica.com.br/serro/>, acesso em: 15/01/2019

IPHAN. Instituto de Patrimônio Histórico, Artístico e Natural. *Queijo Artesanal de Minas vira patrimônio cultural*. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033/queijo-artesanal-de-minas-vira>

patrimônio-cultural, Acesso em: 10/01/2019

ISO. International Organization and Standardization, 1999a. ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal of Method for the Enumeration of Coagulase Positive *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* and Other species). Technique Using Baird-Parker Agar Medium, International Organization Standardization, Geneva.

ISO. International Organization and Standardization, 1999b. ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal of Method for the Enumeration of Coagulase Positive *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* and Other species). Technique Using Rabbit Plasma Fibrinogen agar medium, International Organization Standardization, Geneva.

LAW, B. A.; TAMINE; A. Y. Thecnology and Cheesemaking: 2. ed, United Kingdon: Editora Willey Blackwell, 2011.

MINAS GERAIS. Decreto n. 44.864, de 1º de agosto de 2008. Altera a lei n. 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal, Minas Gerais. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;minas.gerais:estadual:decreto:2008-08-01;44864>

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro Agropecuário. Lei n. 14.185, 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal, Minas Gerais, 2002. Disponível em: http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf, Acesso em: 15/01/2019

MELLO, P. L.; RIBOLI, D. F. M.; PINHEIRO, L.; MARTINS, L. de A.; BRITO, M. A. V. P.; DA CUNHA, M. de L. R. de S. Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2016.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - Utilização no Brasil. **Ciências Agrárias**, p. 115–126, 2000.

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

PIRES, M. C. S. Memória e Arte do Queijo do Serro: o saber sobre a mesa. Belo Horizonte. Editora UFMG, 2013, p. 9.

PORCELLATO, D.; ASPHOLM, M.; SKEIE, S. B.; MONSHAUGEN, M.; BRENDEHAUG, J.; MELLEGÅRD, H. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. November 2017, p. 21–30, 2018.

RAHIMI, E.; ALIAN, F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow,

camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. **Veterinarski Arhiv**, v. 83, n. 1, p. 23–30, 2013.

RODRÍGUEZ, A.; GORDILLO, R.; ANDRADE, M. J.; CÓRDOBA, J. J.; RODRÍGUEZ, M. Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products. **Food Control**, v. 60, p. 302–308, 2016.

TERAMURA, H.; IWASAKI, M.; OGIHARA, H. Evaluation of the Quantitative Dry Culture Method Sanita- kun TM SA for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Artificially Contaminated Food Samples. **Biocontrol Science**, v. 20, n. 4, p. 297–301, 2015.

THAKER, H. C.; BRAHMBHATT, M. N.; NAYAK, J. B. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in anand, gujarat. **Veterinary World**, v. 6, n. 1, p. 10–13, 2013.

VIANA, F. R.; OLIVEIRA, A. D. L.; CARMO, L. S.; ROSA, C. A. Occurrence of coagulase-positive Staphylococci, microbial indicators and physical-chemical characteristics of traditional semihard cheese produced in Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 372–377, 2009.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the PetrifilmTM Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 447–452, 2010.

VIÇOSA, G. N. *Identificação do potencial enterotoxigênico de Staphylococcus spp. isolados de leite cru e queijo frescal*. 2012, f. 116. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H.; GONG, W.; WANG, Z. A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, 2016.

ZHANG, F.; WANG, Z.; LEI, F.; WANG, B.; JIANG, S.; PENG, Q.; ZHANG, J.; SHAO, Y. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 2017.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a inocuidade do Queijo do Serro – Serro, MG e caracterizar o potencial enterotoxigênico de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos das amostras analisadas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a inocuidade de amostras de Queijo do Serro;
 - Pesquisa de *Salmonella*;
 - Pesquisa de *Listeria* spp.;
 - Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas
- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de Queijo do Serro – Serro, MG;
- Comparar o desempenho de dois diferentes sistemas de enumeração de *Staphylococcus* spp.;
- Investigar a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas nos isolados;
- Avaliar a capacidade de produção de enterotoxinas.

**4. SCIENTIFIC ARTICLE - Serro Artisanal Cheese Produced in Brazil has a
Microbial Safety Status for Consumers**

Milimani Andretta et al., 2019

Manuscript organized based on the guidelines from Journal of Dairy Science, IF: 2.749
(2017 Journal Citation Reports, based on Clarivate Analytics, 2018)

Title page

Serro Artisanal Cheese produced in Brazil has a Microbial Safety status for Consumers

M. Andretta,* T. T. Almeida,† L. R. Ferreira,† A. F. Carvalho,† R.S. Yamatogi,* and L.
A. Nero*¹

*Departamento de Veterinária, and

†Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 36570-
900, Viçosa, MG, Brazil

¹Corresponding author: nero@ufv.br

ABSTRACT

Artisanal Minas cheese has socioeconomic, historical and cultural importance, being produced with techniques transmitted from generation to generation. It is named according to their region of origin, such as Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá and Triângulo. The cheeses are extensively handled and subjected to microbiological contamination during production. This product has specific legislation, which regulates the production, inspection and retail sale. Bacteriological research is essential in the production of safe food, since it often allows to understand the hygienic conditions of production. The objective of the present study was to evaluate the microbiological safety of artisanal cheeses produced in the region of Serro, Minas Gerais, Brazil, evaluating the performance of Petrifilm™ STX for enumeration of *Staphylococcus* spp. A total of 53 samples of artisanal cheese from Serro were collected and subjected to the research of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. and enumeration of *Staphylococcus* spp. Artisanal cheese samples and the obtained *Staphylococcus* isolates were submitted to PCR to search for genes related to classical staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED and SEE) and ELISA to detect the presence and production of these enterotoxins. None sample presented positive results for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. *Staphylococcus* spp. counts were variable, depending on the enumeration protocol adopted, but in general, counts were significantly higher with Baird-Parker when compared to Petrifilm™ STX ($p < 0.05$). None of the samples presented a positive result for the presence of enterotoxins, nor amplification of PCR products for the classic enterotoxins. *S. aureus* isolates did not produced staphylococcal enterotoxin nor presented the enterotoxin-related genes. The results indicated poor hygienic conditions in the production of cheese, due to the high frequencies of samples that presented coagulase positive *Staphylococcus* counts higher than the limits allowed by the current legislation. However, a safety status of the samples was recorded due to the absence of common foodborne pathogens and toxins, often described as common hazards associated with cheeses made from raw milk.

Key-Words: *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp.; *Staphylococcus* sp., handling

INTRODUCTION

The consumption of artisanal cheeses is increasing worldwide, due to consumers demand for natural and non-added of chemicals foods, and to valorization of cultural and historical aspects of different countries (CLAEYS et al., 2013). The cheeses produced in Minas Gerais state are probably the oldest and more traditional artisanal products made in Brazil, and they are named according to their origin region, such as Serro, Salitre, Campos das Vertentes, Canastra, Araxá and Triângulo (DORES; FERREJRA, 2012). The production of these artisanal cheeses has a socioeconomic relevance for the dairy farmers, leading to an official support from Minas Gerais state government that established in 2002 specific guidelines for production, including health of the producing animals, hygiene during production and microbiological parameters for quality and safety of end products (MINAS GERAIS, 2002). Also, Minas artisanal cheeses were recognized as a Brazilian Historical Patrimony (IPHAN, 2008), and the cheeses produced in Serro region received an indication of Geographic Origin Denomination (INPI, 2011), improving their valorization in retail sale.

Serro artisanal cheeses (SAC) are produced with raw milk and subjected to ripening for 17 to 22 days, resulting in a semi-hard cheese with a compact texture, white to yellowish, salty and characterized by presenting flower notes and a spicy flavor (EMATER, 2017). Despite being very well accepted by consumers, SAC has a limited number of scientific studies that assess its quality and safety; in general, it is accepted that the SAC production lacks standard procedures, resulting in poor hygiene quality of the end products (BRANT et al., 2007). This scenario rouses the development of proper scientific studies that aim the assessment of the microbiological characteristics of SAC, in order to generate reliable data that can support the enhancement of SAC quality and safety.

As SAC is produced with raw milk, it is susceptible to contamination by pathogenic bacteria that can pose as potential hazards and risks to human health (NERO; CARVALHO, 2019). A variety of foodborne pathogens can pose as potential hazards associated to artisanal foods, and intoxication by enterotoxins produced by *Staphylococcus* is commonly associated to consumption of raw milk cheeses (CLAEYS et al., 2013). *Staphylococcus* spp. are naturally present in mammals skin and mucosa, and it is often associated to mastitis in dairy cattle (NOVAKOVIC; GRUJIC, 2017). High *Staphylococcus* counts can be considered as a good indicative of poor handling practices (JOHLER et al., 2018). Despite this characteristic, some *Staphylococcus* strains can be able to produce enterotoxins; once produced, the enterotoxins are not destroyed by any heat treatment in the dairy industry, remaining active and the becoming the causative agent of staphylococcal food poisoning (WASSENBERG et al., 2010; HASAN et al., 2014).

Thus, monitoring *Staphylococcus* spp. populations is important to assure the quality and safety of dairy products, including artisanal cheeses. The ability of producing enterotoxins was usually associated to virulence features of *Staphylococcus*, like the coagulase and DNase (HAAS et al., 2014). Because of this supposed association, enumeration protocols usually consider the quantification of coagulase or DNase positive *Staphylococcus* (ISO 1999, FDA 2001, BRASIL 2003). However, nowadays it is a consensus that it is necessary the detection of enterotoxins, as well as the research of the enterotoxigenic potential of the *Staphylococcus* strains, to assure the safety of the artisanal cheeses.

Based on the significance of artisanal cheeses safety and the relevance of *Staphylococcus* in this product, the present study aimed to assess the microbial safety of SAC. Special attention was dedicated to the characterization of the enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* strains isolated from SAC.

MATERIAL AND METHODS

Samples and dilutions

A total of 53 SAC samples was collected from different producers and kept under refrigeration until microbiological analysis. Then, portions of 25 g of each sample was aseptically collected and transferred to sterile bags added with 225 mL of citrate solution (0.85%, w/v) and ten fold diluted in NaCl 0.85% (w/v).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes was assayed based on WHER; FRANK (2004). Portions of 25 g of each sample were transferred to sterile bags, added with 225 mL of *Listeria* Enrichment Broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) and incubated at 30 °C for 48 h. Then, the obtained cultures were streaked onto plates containing Palcam and Oxford agars (Oxoid), and incubated at 35 °C for 48 h. Colonies that presented suspect *Listeria* morphology (small, black and surrounded by black halos) were purified on trypticase soya agar (TSA, Oxoid), subjected to DNA extraction (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega Corporation, Madison, WI, USA) and PCR assays for identification (DOUMITH et al., 2004; HUDSON et al., 2001). Primers, product sizes and PCR conditions are detailed in Table 1.

Salmonella spp.

The presence of *Salmonella* spp. was conducted based on the protocol described in ISO 6579 (ISO, 2002). Portions of 25 g of each SAC were transferred to sterile bags, added with 225 mL of buffered peptone water (Oxoid) and incubated at 35 °C for 18 h. Then, aliquots of the obtained cultures were transferred to Rappaport Vassiliadis (Oxoid) and Muller Kauffmann Tetrathionate (Oxoid), followed by incubation at 41 °C and 35 °C,

respectively, for 24 h. The obtained cultures were then streaked onto plates containing Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar (MLCB - Oxoid) and Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD - Oxoid) and incubated at 35 °C for 24 h. Colonies that presented *Salmonella* characteristic morphologies (MLCB: dark grey, rounded; XLD: black centered, rounded) were purified on TSA (Oxoid) and subjected to further biochemical tests for identification (ISO, 2002).

Staphylococcus spp.

Dilutions of SAC samples were selected and surface plated onto Baird Parker agar (Oxoid), according to ISO 6888-1 (ISO, 1999), and Petrifilm™ STX plates (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA). Plates were incubated at 35 °C for 24 and 48 h, when colonies that presented *Staphylococcus* spp. characteristic morphologies were enumerated and selected for additional characterization. In Baird Parker, *Staphylococcus* typical colonies were circular, smooth, convex, gray to jet-black, with a light-colored margin surrounded by two halos: one opaque and one clear. In Petrifilm™ STX, *Staphylococcus* typical colonies were circular, red purple and surrounded by a pink halo.

The selected colonies were subjected to Gram staining, and catalase, coagulase and DNase production (ISO, 1999). Isolates that presented biochemical characteristics coherent with coagulase positive *Staphylococcus* were subjected to DNA extraction (as described above) and a PCR assay targeting *nucA*, according BARON et al. (2004), for *S. aureus* identification. Primers, product sizes and PCR conditions are detailed in Table 1.

Based on the obtained results, coagulase positive *Staphylococcus*, DNase positive *Staphylococcus* and *S. aureus* counts were estimated per SAC sample and adopted method, and expressed as UFC/g.

Staphylococcus enterotoxins

Aliquots of 10 g of the SAC were transferred to sterile bags and added with 15 mL of PBS buffer and subjected to and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect classical *Staphylococcus* enterotoxins (SE): SEA, SEB, SEC, SED and SEE (Ridascreen Set Kit SEA-SEE, R-Biopharm, Darmstadt, Germany). Total DNA from SAC samples were obtained by using the PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) and subjected to PCR assays targeting classical enterotoxins related genes: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* (ROSEC; GIGAUD, 2002). Primers, product sizes and PCR conditions are detailed in Table 1.

DNA from *Staphylococcus* isolates that presented amplification for *nucA* were subjected to rep-PCR using a single primer RW3A, according the protocol described by VECCHIO et al., (1995). Primer sequence and PCR conditions are detailed in Table 1. Based on the recorded genetic profiles, isolates were selected and subjected to PCR assays targeting classical enterotoxins related genes: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*, as described above. Also, the selected isolates were subjected to the ELISA to detect the same classical SEs, as described above.

Data analysis

SAC samples were categorized based on presence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp., and counts of *Staphylococcus* (coagulase, DNase and *S. aureus*), being compared based on official standards from Brazil and European Union (MINAS GERAIS, 2002; EUROPE UNION, 2005). Also, the recorded *Staphylococcus* counts were converted to log₁₀ and compared considering the adopted enumeration protocol by analysis of variance (ANOVA) and Fisher (p < 0.05). The frequencies of confirmed *Staphylococcus* spp. isolates obtained considering the different enumeration protocols were compared by Chi-

Square and Marascuilo procedure ($p < 0.05$). Data analysis was conducted using the software XLSTAT 19.01 (Addinsoft, New York, NY, USA).

Table 1: Oligonucleotides used for identification of *S. aureus*, staphylococcal enterotoxins (EE), confirmation of *Listeria* in genus and species, both by polymerase chain reaction (PCR).

target	primers	Desnaturation (°C)	Annealing (°C)	Extension (°C)	Product size (bp)	Reference
<i>nucA</i> ¹	F: TGCTATGATTGTGGTAGCCATC R: TCTCTAGCAAGTCCCTTTTCCA	95 °C, 30''	55 °C, 30''	72 °C, 30''	420 bp	(BARON et al., 2004)
<i>sea</i> ²	F: ACGATCAATTTTTACAGC R: TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	95 °C, 45''	46.2 °C, 45''	72 °C, 30''	544 bp	(ROSEC; GIGAUD, 2002)
<i>seb</i> ²	F: GAATGATATTAATTCGCATC R: TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	95 °C, 45''	46.2 °C, 45''	72 °C, 30''	416 bp	
<i>sec</i> ²	F: GACATAAAAGCTAGGAATTT R: AAATCGGATTAACATTATCCA	95 °C, 45''	46.2 °C, 45''	72 °C, 30''	257 bp	
<i>sed</i> ²	F: TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT R: CCACCATAACAATTAATGC	95 °C, 45''	46.2 °C, 45''	72 °C, 30''	334 bp	
<i>see</i> ²	F: ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA R: TAACTTACCGTGGACCC	95 °C, 45''	46.2 °C, 45''	72 °C, 30''	1,702 bp	
<i>hly</i> ³	F: GCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATC R: CTTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGC	95 °C, 40''	62 °C, 1'	72 °C, 1'	706 bp	(HUDSON et al., 2001)
<i>prs</i> ⁴	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	95 °C, 1'	53 °C, 1'	72 °C, 1.15'	370 bp	(DOUMITH et al., 2004)
<i>sw3a</i> ⁵	5' TCGCTCAAAACAACGACACC 3'	95 °C, 1'	54 °C, 1'	72 °C, 2'		(VECCHIO et al., 1995)

¹ PCR with initial denaturation of 95 °C for 5', 30 cycles of denaturation, annealing and extension, final extension was done at 72 °C for 5'

² PCR with initial denaturation of 95 °C for 5', 35 cycles of denaturation, annealing and extension, final extension was done at 72 °C for 10'

³ PCR with initial denaturation of 95 °C for 5', 40 cycles of denaturation, annealing and extension, final extension was done at 72 °C for 8'

⁴ PCR with initial denaturation of 95 °C for 5', 35 cycles of denaturation, annealing and extension, final extension was done at 72 °C for 7'

⁵ rep-PCR with initial denaturation of 95 °C for 5', 40 cycles of denaturation, annealing and extension, final extension was done at 72 °C for 10'

RESULTS AND DISCUSSION

None of the 53 SAC samples presented positive results for *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp.; *Listeria* spp. was recorded in only one sample. SOARES et al., (2018) also did not isolated these foodborne pathogens from artisanal cheeses produced in Minas Gerais with different ripening times. Also, SANTOS et al., (2010) did not observed positive results for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in SAC samples. Contamination by pathogenic microorganisms can occur at different steps during artisanal cheese production, being potentially originated from the raw milk obtained from infected animals, and also from milking and producing environment (MELO et al., 2015). In addition, raw milk cheeses contain an autochthonous rich lactic microbiota that can be able to produce a number of antimicrobial substances, such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins, that can inhibit the growth of eventually present foodborne pathogens, such as *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. (CLAEYS et al., 2013; YOON et a., 2016). The results recorded for these foodborne pathogens in SAC samples are in compliance with the current Brazilian and European legislations that describes the microbiological standards for artisanal cheeses (MINAS GERAIS, 2002; EUROPE UNION, 2005).

Despite the negative results for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp., SAC samples presented variable results for *Staphylococcus*, depending on the adopted enumeration protocol. These counts were significantly higher when the results obtained from Baird-Parker (ISO) were compared to Petrifilm™ STX ($p < 0.05$, Table 2).

Table 2: Relationship of counts between the culture medium (Petrifilm™ Staph Express (STX) and Baird Parker and the morphologies searched, in addition to grouping according to the counting averages.

Method	Mean count	
	24h	48h
Petrifilm STX - total	3.70 ± 0.12 ^c	3.81 ± 0.12 ^c
Petrifilm STX - coag	3.46 ± 0.14 ^c	3.57 ± 0.13 ^c
Petrifilm STX - DNase	3.55 ± 0.14 ^c	3.64 ± 0.13 ^c
Petrifilm STX - <i>S. aureus</i>	3.46 ± 0.14 ^c	3.55 ± 0.13 ^c
Baird Parker - total	-	5.08 ± 0.10 ^a
Baird Parker - coag	-	4.64 ± 0.12 ^b
Baird Parker - DNase	-	4.77 ± 0.12 ^b
Baird Parker - <i>S. aureus</i>	-	4.57 ± 0.12 ^b

p < 0.05 indicates significant differences by ANOVA and Fisher F = 25.16, df = 11, p < 0.0001 Mean values ± standard error (log CFU/g).

Baird-Parker agar is a selective culture medium that theoretically provides the enumeration of *Staphylococcus* colonies that can present different morphologies and demand additional biochemical tests to check their pathogenic characteristics, like coagulase, while Petrifilm™ STX targets the direct enumeration of DNase positive *Staphylococcus* (VIÇOSA et al., 2010). Considering the data described in Table 3, it was possible to identify significant differences in the frequencies of confirmatory results for the identification of typical and atypical colonies obtained from Baird Parker and Petrifilm™ STX; colonies from Petrifilm™ STX presented higher frequencies of confirmed results for coagulase, DNase and *S. aureus* (p < 0.05), demonstrating that the results obtained by this protocol can be considered more accurate than the counts obtained by Baird Parker. BOARI et al., (2002) confirmed the ability in produce coagulase by atypical colonies from Baird Parker, while INGHAM et al., (2003) have identified Baird Parker typical colonies that did not produce coagulase. In addition, higher frequencies of colonies that presented typical characteristics for lactic acid bacteria (Gram positive, catalase negative) were

observed in Baird Parker when compared to Petrifilm™ STX ($p < 0.05$, Table 3), confirming the poor selectivity of this culture medium, what can jeopardize the precision of its *Staphylococcus* counts.

Based on confirmatory results for typical and atypical colonies obtained from Baird Parker and Petrifilm™ STX, SAC samples were categorized based on their estimated *Staphylococcus* counts (coagulase, DNase and *S. aureus*, Table 4). Based on the reference values from current legislation, raw milk cheeses ideally must present coagulase positive *Staphylococcus* counts below 10^2 CFU/g (MINAS GERAIS, 2002); both Baird Parker and Petrifilm™ STX allowed similar categorization of SAC samples in the present study (Table 4). However, considering the reference values from current European legislation (10^4 CFU/g for coagulase positive *Staphylococcus* (EUROPE UNION, 2005), Baird Parker counts indicated a higher number of SAC samples with counts above this limit when compared to counts obtained by Petrifilm™ STX (Table 4). Similar patterns were observed for DNase *Staphylococcus* and *S. aureus* counts (Table 4). Despite the higher precision of *Staphylococcus* counts obtained by Petrifilm™ STX, the counts recorded by using Baird Parker must be considered as reference to assess the microbiological quality and safety of the SAC samples, once it is included in the official enumeration protocols (MINAS GERAIS, 2002). These data indicate the high contamination by *Staphylococcus* in the SAC samples included in this study, in agreement with similar studies with artisanal cheeses (BRANT et al., 2007; DORES et al., 2013; DIAS et al., 2016; VINHA et al., 2018).

Table 3: Frequencies of isolates characterized morphologically, according to the culture medium and with their morphological characteristics.

Culture medium	Colony morphology	n	Gram positive cocci, catalase positive			Gram positive, catalase negative
			Coagulase	DNase	<i>S. aureus</i>	
Baird Parker	typical	155	75 (48.4%) ^b	96 (61.9%) ^b	54 (34.8%) ^b	27 (17.4%) ^b
	atypical	711	275 (38.7%) ^b	331 (46.6%) ^c	262 (36.8%) ^b	286 (40.2%) ^a
Petrifilm STX	typical	185	141 (76.2%) ^a	168 (90.8%) ^a	137 (74.1%) ^a	2 (1.1%) ^c
	atypical	113	17 (15.0%) ^c	23 (20.4%) ^d	13 (11.5%) ^c	53 (46.9%) ^a
Statistics*	Chi-Square		125.9	171.4	132.2	130.8
	Degrees of Freedom		3	3	3	3
	p		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

* For each group, frequencies followed by different uppercase letters are significantly different by Marascuilo Procedure

Table 4: Number of samples that presented *Staphylococcus* counts within their respective ranges obtained by Baird Parker and Petrifilm™ STX (CFU/g).

Counts (CFU/g)	Baird Parker			Petrifilm™ STX		
	CPS	DNase	<i>S. aureus</i>	CPS	DNase	<i>S. aureus</i>
< 100	12	11	14	18	15	18
100 - 1,000	1	1	0	10	9	12
1,000 - 10,000	6	3	6	15	15	13
10,000 - 100,000	20	21	19	8	12	8
> 100,000	14	17	14	2	2	2
Total	53	53	53	53	53	53

CPS: coagulase positive *Staphylococcus*

Based on European legislation, only artisanal cheese batches that present samples with coagulase positive *Staphylococcus* counts higher than 10^4 CFU/g must be assayed for the presence of SEs (EUROPE UNION, 2005). Also, some studies suggest that SEs are present in cheese samples with coagulase positive *Staphylococcus* counts higher than 10^5 CFU/g (PELISSER et al., 2009; CIUPESCU et al., 2018). Up to date, there is no legislation in Brazil that indicates the research of SEs in artisanal cheeses (ANVISA, 2001; MINAS GERAIS, 2002; BRASIL, 2003). Independently of the *Staphylococcus* counts, all SAC samples were subjected to the ELISA assay to detect the presence of SEs. Despite the SAC samples presented relative high counts of *Staphylococcus* (Tables 2 and 4), none of them presented positive results for the presence of the classical SEs assayed by ELISA, nor presented amplification of PCR products for the *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*. These results indicate that the SAC samples did not pose as a direct risk related to SEs for consumers, as well (ROLA et al., 2013; JOHLER et al., 2015) did not found SE at different stages of production of raw milk cheese, even at the end products.

The safety aspect related to SEs in the SAC samples were confirmed by the analysis of enterotoxigenic production and potential by the obtained *Staphylococcus* isolates. A total of 350 colonies from Baird Parker and 158 from Petrifilm™ STX

were subjected to rep-PCR, resulting in 162 genetic profiles that allowed the selection of 174 isolates that were subjected to PCR assays targeting the classical SE related genes; none of them presented their typical amplification products. Also, 116 *Staphylococcus* isolates were selected and subjected to the ELISA assay targeting their production of classical SE; none of them presented SE production. JOHLER et al., (2015) also did not find classical SE in an outbreak involving five people who ate cheese produced with goat's milk, but identified isolated with the following SE related genes: *sec*, *sei*, *sin* and *seo*. MARTINS et al., (2014) also did not found classical SE in semi-ripened Minas cheese produced with raw milk.

Based on the current guidelines for artisanal cheese production in Minas Gerais, the raw milk used for their production must be obtained from healthy animals and *Staphylococcus* counts must be below 10^2 CFU/mL, and cheese production must start in a period no longer than 90 min after milking (Law 14.185, MINAS GERAIS, 2002). Thus, enumeration and characterization of *Staphylococcus* spp. is important to evaluate potential factors that may become a risk to the consumer, what can be considered as reliable tools to support quality control programs, such as Hazard Analysis and Critical Control Points and Good Manufacturing Practices (DING et al., 2016). Considering that the contamination can occur by direct contact with the hands of the manipulators or through coughs and sneezes (NOVAKOVIC; GRUJIC, 2017), the high counts identified by the present study indicate hygienic failure in the SAC production (Tables 2 and 4).

CONCLUSIONS

The absence of *Staphylococcus* with enterotoxigenic potential and absence of pathogens such as *Salmonella* and *L. monocytogenes* indicate that SAC are relatively safe, not posing as potential risks for developing foodborne diseases in consumers. The results indicate a low accuracy of Baird Parker agar and probably a low sensitivity of Petrifilm™ STX, however, high *Staphylococcus* counts in SAC indicate poor hygiene conditions during processing, demanding further studies that investigate the major key points for controlling contamination in order to enhance the microbial quality of this product.

ACKNOWLEDGMENTS

CNPq, CAPES (financial code 001) and FAPEMIG.

REFERENCES

- ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Anvisa**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2001.
- WEHR, H. M.; FRANK, J. F. *Standar Methods for the Examination of Dairy Products*: 17 ed. APHA, Washington, DC, USA, 2004.
- BARON, F.; COCHET, O.; PELLERIN, J.; ZAKOUR, N. B. E. N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LOIR, Y. L. E.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2302–2305, 2004.
- BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M. C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar baird-parker em queijos maturados. **B. Ceppa**, v. 20, n. 2, p. 347–354, 2002.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570–1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controles de Produtos de Origem Animal e Água, edição federal, São Paulo, 2003. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>, Acesso em 15/01/2019

CLAEYS, W. L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.; VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; SILVACARVALHO, V.; BATISTA, D. S. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, p. 57–64, 2016.

DING, T.; YU, Y.; SCHAFFNER, D. W.; CHEN, S.; YE, X.; LIU, D. Farm to consumption risk assessment for *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in fluid milk in China. **Food Control**, v. 59, p. 636–643, 2016.

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

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

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3819–3822, 2004.

EUROPE UNION, C. Regulamento (CE) n.º 2073-2005. **Jornal Oficial da União Europeia L 338 de 22 de Dezembro de 2005**, p. 1–26, 2005.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. *Produção de Queijo Minas Artesanal ganha reforço com o atendimento a 600 produtores familiares no estado*. 2017. Disponível em: http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=novosite_pagina_interna&id=20360. Acesso em: 15/01/2019

FDA. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual: *Staphylococcus aureus*, 2001. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>, Acesso em: 15/01/2019.

HAAS, B.; BONIFAIT, L.; VAILLANCOURT, K.; CHARETTE, S. J.; GOTTSCHALK, M.; GRENIER, D. Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

HASAN, A. A.; HASSAWI, D. S.; AL-, H. I.; HASAN, A. A. Molecular and Biochemical Identification of Coagulase Positive *Staphylococcus* Species Isolated from Human and Animal Sources in Jordan. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 47, p. 1491-1506, 2014.

HUDSON, J. A.; LAKE, R. J.; SAVILL, M. G.; SCHOLLES, P.; MCCORMICK, R. E. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 614–621, 2001.

INPI. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Serro. 2015, disponível em: <http://indicacao geografica.com.br/serro/>, Acesso em: 15/01/2019

IPHAN. Instituto de Patrimônio Histórico, Artístico e Natural. *Queijo Artesanal de Minas vira patrimônio cultural*. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/noticias/detalhes/2033/queijo-artesanal-de-minas-vira-patrimonio-cultural>, Acesso em: 10/01/2019

ISO. International Organization and Standardization, 1999. ISO 6888-1. Microbiology

of Food and Animal Feeding Stuff. Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus* and Other species). Technique Using Baird-Parker Agar Medium, International Organization Standardization, Geneva.

ISO, 2002. ISO 6579: 2002 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff — Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. ISO, Geneva, Switzerland.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro Agropecuário. Lei n. 14.185, 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal, Minas Gerais, 2002. Disponível em: http://ns.ima.mg.gov.br/intranet/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf, Acesso em: 15/01/2019

INGHAM, S. C.; BECKER, K. L.; FANSLAU, M. A. Comparison of the Baird-Parker agar and 3M Petrifilm Staph Express Count plate methods for enumeration of *Staphylococcus aureus* in naturally and artificially contaminated foods. **Journal Food Protection**, v. 66, n. 11, p. 2151–2155, 2003.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-Encoded enterotoxins. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 997–1004, 2015.

JOHLER, S.; MACORI, G.; BELLIO, A.; ACUTIS, P. L.; GALLINA, S.; DECASTELLI, L. Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. **Journal of Dairy Science**, p. 1–6, 2018.

MARTINS, I. M.; KABUKI, D. Y.; MIYA, N. T. N.; PEREIRA, J. L. Occurrence and Characterization of Enterotoxigenic Potential of *Staphylococcus* Isolated from Dairy Products. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 3, p. 185–192, 2014.

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.

NOVAKOVIC, B.; GRUJIC, R. Importance of adequate hand hygiene of food

handlers in snails meet process. **Journal of Higienic Engenereeing and Design**, v. 67, p. 23–28, 2017.

NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. Raw Milk: Balance between Hazards and benefits. Chapter 3, Editora: Academic Press, 2019.

PORCELLATO, D.; ASPHOLM, M.; SKEIE, S. B.; MONSHAUGEN, M.; BRENDEHAUG, J.; MELLEGÅRD, H. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. November 2017, p. 21–30, 2018.

ROLA, J. G.; KORPYSA-DZIRBA, W.; OSEK, J. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins at different stages of production of raw milk cheeses, preliminary results. **Bull Vet Inst Pullway**, v. 57, p. 341-345, 2013.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n. 1–2, p. 61–70, 2002.

SANTOS, A. S. *Queijo Minas Artesanal da Microrregião do Serro - Minas Gerais: Efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação*. 2010. , f. 67. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Diamantina, Minas Gerais, 2010.

SOARES, D. B.; MONTEIRO, G. P.; FONSECA, B. B.; FREITAS, E. A.; MENDONÇA, E. P.; MELO, R. T. de; IASBECK, J. R.; ROSSI, D. A. Análise Sanitária E Físico-Química E Adequação Bacteriológica Do Queijo Minas Artesanal Produzido Em Duas Propriedades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 0, p. 1–13, 2018.

VECCHIO, V. G. D. E. L.; PETROZIELLO, J. M.; GRESS, M. J.; CLESKEY, F. K. M. C.; MELCHER, G. P.; CROUCH, H. K.; LUPSKI, J. R. Molecular Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via Fluorophore-Enhanced Repetitive-Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2141–2144, 1995.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of

coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 447–452, 2010.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; CHAVES, J. B. P. Estafilococos coagulase positiva em Queijo Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares. **Revista Instituto Laticínios Candido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 62-72, 2018.

WASSENBERG, M. W. M.; BOOTSMAN, M. C. J.; TROELSTRA, A.; KLUYTMANS, J. A. J. W.; BONTEN, M. J. M. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST398) in Dutch hospitals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 2, p. 316–319, 2010.

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

ZHANG, F.; WANG, Z.; LEI, F.; WANG, B.; JIANG, S.; PENG, Q.; ZHANG, J.; SHAO, Y. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7812–7824, 2017.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

- A ausência de patógenos e toxinas estafilocócicas indicam que as amostras de Queijo Minas Artesanal produzidas na região do Serro são microbiologicamente seguras;
- As altas contagens de *Staphylococcus* sp. indicam falhas higiênicas durante a fabricação desses queijos artesanais;
- A ausência de genes relacionados à produção da enterotoxinas clássicas confirmam que altas contagens de *Staphylococcus* sp. não estão diretamente relacionadas com a possibilidade de produção de enterotoxinas.
- É necessário que a legislação brasileira seja atualizada, visando realizar a pesquisa direta de enterotoxinas estafilocócicas no alimento.