

## INVESTIGAÇÃO METAGENÔMICA EM QUEIJOS TIPO COLONIAIS, PRODUZIDOS COM LEITE PASTEURIZADO E COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Ariane Remor<sup>1</sup>  
Tassia Cristina Bello de Vasconcelos<sup>2</sup>  
Vinícius Silva Belo<sup>3</sup>  
Ricardo Zanella<sup>1</sup>  
Ezequiel Davi dos Santos<sup>1</sup>  
Elci Lotar Dickel<sup>1</sup>

### RESUMO

Leite e derivados são alimentos muito susceptíveis a ataques de micro-organismos. Sua fiscalização no Brasil está a cargo das Inspeções Municipais, Estaduais ou Federais, sendo a verificação da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos uma atividade de extrema importância. Este estudo utilizou a análise metagenômica para investigar sequências genéticas microbianas em 12 marcas de queijo tipo colonial produzidos sob diferentes regimes de fiscalização pública, e comercializados no estado do Rio Grande do Sul em dois municípios distintos. Foi identificado DNA de micro-organismos pertencentes a quatro filos microbianos: Acinetobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria. Dentre os resultados mais relevantes, sequências genéticas de micro-organismos patogênicos ou prejudiciais à tecnologia do leite foram evidenciados, com os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* ocorrendo em 100% das amostras avaliadas. Outras bactérias de importância em saúde pública, como as pertencentes à Família Enterobacteriaceae e o gênero *Staphylococcus* foram detectados e são discutidos. À comparação das medianas de detecção nos 3 níveis de fiscalização, quando da avaliação por pares, evidenciou-se diferença estatística entre as esferas municipal e federal ( $P_T= 0,03$ ), com maior mediana registrada em nível municipal. À avaliação entre os municípios, não foi evidenciada diferença significativa ( $P_{MW}= 0,81$ ). Sugere-se melhor qualidade microbiológica do queijo, e/ou leite utilizado como matéria-prima, pertencentes à produção submetida à Inspeção Federal em relação à Municipal.

**Palavras-chaves:** queijo tipo colonial; metagenômica; inspeção de produtos de origem animal; saúde pública.

### METAGENOMIC INVESTIGATION IN COLONIAL CHEESE PRODUCED WITH PASTEURIZED MILK AND SOLD IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

### ABSTRACT

Milk and dairy products are very susceptible foods to microorganism attacks. Its control in Brazil is submitted to Municipal, State or Federal Inspections, and verification of the hygienic-sanitary quality of food is an extremely important activity. This study used metagenomic analysis to investigate microbial genetic sequences in 12 brands of colonial cheese produced under different Public Inspection regimes and sold in two different

<sup>1</sup> Universidade de Passo Fundo. ariemor@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Pesquisadora Independente. Correspondência: tassia.vasconcelos@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de São João del-Rei. viniusbelo4@hotmail.com

municipalities in the state of Rio Grande do Sul. DNA from microorganisms belonging to four microbial Phyla have been identified: Acinetobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. Among the most relevant results, genetic sequences of pathogenic microorganisms or harmful to milk technology were evidenced, with *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* bacterias occurring in 100% of the evaluated samples. Other public health important bacterias, such as those belonging to the Enterobacteriaceae and *Staphylococcus* spp. were detected and discussed. Comparing the detection medians in the 3 levels of inspection by peer evaluation, a statistical difference was highlighted between the Municipal and Federal levels ( $P_T= 0,03$ ), with the highest median recorded at Municipal level. It is suggested better microbiological quality of cheese, and / or milk used as raw material, when they belong to the production submitted to the Federal Inspection in relation to Municipal one.

**Key words:** colonial cheese; metagenomic; inspection of animal origin products; public health.

## INVESTIGACIÓN METAGENÓMICA EN QUESOS DE TIPO COLONIAL, PRODUCIDOS CON LECHE PASTEURIZADA Y COMERCIALIZADOS EN EL ESTADO DE RÍO GRANDE DO SUL, BRASIL

### RESUMEN

La leche y los derivados son alimentos muy susceptibles a los ataques de microorganismos. Su fiscalización en Brasil es responsabilidad de las inspecciones municipales, estatales o federales, y la verificación de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos es una actividad extremadamente importante. Este estudio utilizó el análisis metagenómico para investigar secuencias genéticas microbianas en 12 marcas de queso colonial con producción sometida a diferentes regímenes de inspección pública, y comercializadas en el estado de Rio Grande do Sul en dos municipios diferentes. Se han identificado ADN de microorganismos pertenecientes a cuatro filamentos microbianos: Acinetobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Entre los resultados más relevantes, se evidenciaron secuencias genéticas de microorganismos patógenos o nocivos para la tecnología de la leche, con detección de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* en el 100% de las muestras evaluadas. Se detectaron y discutieron otras bacterias de importancia para la salud pública, como las que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y el género *Staphylococcus*. La comparación de las medianas de detección en los 3 niveles de inspección, cuando la evaluación por pares, mostró una diferencia estadística entre los niveles municipales y federales ( $P_T= 0,03$ ), con la mediana más alta registrada a nivel municipal. En la evaluación entre los municipios, no se evidenciaron diferencias significativas ( $P_{MW} = 0.81$ ). Se sugiere una mejor calidad microbiológica del queso, y / o leche utilizada como materia prima, perteneciente a la producción sometida a la Inspección Federal en relación con el Municipal.

**Palabras Clave:** queso de tipo colonial; metagenómica; inspección de productos de origen animal; salud pública.

### INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são considerados fontes alimentícias muito nutritivas, utilizadas pelo homem desde os primórdios da civilização e que movimentam boa parcela da economia

do mundo (1). O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção leiteira, sendo a região Sul a maior produtora de lácteos do país (2).

A riqueza nutricional desses alimentos se dá pela concentração de proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais. Assim, devido a essa composição, são considerados alimentos extremamente susceptíveis ao ataque de numerosos tipos de micro-organismos, sejam esses ambientais, do próprio animal ou veiculados pelo homem e/ou pelos utensílios de ordenha, sendo muitos potencialmente patogênicos (3).

No Brasil, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal disciplina e normatiza a produção de lácteos a partir de leite pasteurizado, tanto para estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal, quanto para os de Inspeção Estadual ou Municipal (4). Apesar de a designação queijo colonial ainda se encontrar, no imaginário popular, intimamente associada com a produção de queijos a partir do leite sem tratamento térmico, pequenos e grandes laticínios se apropriaram da designação “artesanal”, porém produzindo queijo colonial a partir de leite pasteurizado e culturas iniciadoras puras (5).

A industrialização e maior mecanização dos processos de produção de queijos trouxeram benefícios, porém não se tornaram infalíveis. Falhas no controle de qualidade tanto da matéria-prima, quanto no seu beneficiamento e estocagem, podem resultar na sobrevivência ou contaminação da massa do queijo por micro-organismos patogênicos e/ou prejudiciais à tecnologia láctea. Isso pode originar um produto de má qualidade tecnológica e microbiológica, além de poder causar infecções, intoxicações ou toxinfecções nos consumidores (6).

A monitorização da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, sobretudo dos produtos de origem animal é extremamente importante. Diante disso, nos últimos anos, a análise metagenômica tem se destacado como uma metodologia capaz de identificar uma ampla diversidade de bactérias presentes em uma amostra, por meio da aplicação de sequenciamento de DNA em larga escala (7).

Dessa forma, o presente estudo utilizou a análise metagenômica para investigar sequências genéticas microbianas em 12 marcas de queijo tipo colonial, produzidos sob fiscalização das três esferas de Serviço de Inspeção Oficial (Municipal, Estadual e Federal), e comercializados nas cidades de Passo Fundo e Erechim, Rio Grande do Sul.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Desenho do estudo***

Trata-se de estudo transversal-seccional, conduzido com uma amostra de conveniência composta por 12 marcas de queijo colonial, submetidas aos diferentes Sistemas de Inspeção Oficial (Municipal, Estadual ou Federal) e adquiridas de forma aleatória, em mercados tradicionais, nos municípios de Erechim e Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul (RS). Com o objetivo de avaliar o microbioma dos queijos tipo coloniais foi realizada análise metagenômica das amostras adquiridas, buscando-se evidenciar a presença de DNA de micro-organismos patogênicos ou prejudiciais à tecnologia do leite, assim como possíveis associações entre os resultados e os Sistemas de Inspeção aos quais as marcas estão submetidas.

### ***Caracterização e preparo das amostras***

Foram adquiridas 6 marcas de queijo tipo colonial por município (Erechim ou Passo Fundo), sendo 2 submetidas a Sistema de Inspeção Municipal, 2 a Sistema de Inspeção Estadual e 2 a Sistema de Inspeção Federal.

Os queijos foram adquiridos em sua embalagem original e posteriormente desembalados em câmara de fluxo laminar, onde foram coletadas 100g de cada unidade. As amostras foram alocadas em sacos plásticos estéreis, identificados com as iniciais do município de origem de cada queijo e o serviço de inspeção ao qual a produção era submetida. As amostras foram mantidas refrigeradas (4-8°C) e em seguida enviadas para análise metagenômica.

### **Análise Metagenômica**

Para a identificação de bactérias, utilizou-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina Inc., USA), utilizando o kit V2 de 300 ciclos, *single-end*, sem normalização das bibliotecas. As sequências de DNA dos micro-organismos foram analisadas por meio de um *pipeline* próprio (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil), considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. Para a identificação das espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados contendo outras sequências de DNA de espécies já caracterizadas. Posterior às análises de bioinformática, os resultados foram carregados na plataforma Neobiome (ID OS18064.1) para visualização e avaliação. Foram pesquisadas sequências de 109 gêneros bacterianos, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de Gêneros bacterianos pesquisados por metagenômica em queijos tipo Colonial, submetidos a níveis de Inspeção Municipal, Estadual ou Federal, coletados nos municípios de Erechim e Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul

<b>Gêneros Bacterianos</b>			
<i>Achromobacter</i>	<i>Cloacibacterium</i>	<i>Grimontella</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Psychromonas</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Coprococcus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Rahnella</i>
<i>Advenella</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Kluyvera</i>	<i>Raoultella</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Roseburia</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Rothia</i>
<i>Alkalibacterium</i>	<i>Delftia</i>	<i>Lelliottia</i>	<i>Ruminiclostridium</i>
<i>Aminobacter</i>	<i>Diaphorobacter</i>	<i>Macrococcus</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Anaerostipes</i>	<i>Dorea</i>	<i>Marinomonas</i>	<i>Serratia</i>
<i>Arcobacter</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Empedobacter</i>	<i>Morganella</i>	<i>Shinella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Solibacillus</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Blastochloris</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Sphingobium</i>
<i>Blautia</i>	<i>Epilithonimonas</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Brachybacterium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Brevundimonas</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Thermomonas</i>
<i>Brochothrix</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Paraprevotella</i>	<i>Tiedjeia</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Ewingella</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Uruburuella</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Phytobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Chromohalobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Piscicoccus</i>	<i>Weissella</i>
<i>Citricoccus</i>	<i>Fusicatenibacter</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Yersinia</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Granulicatella</i>	<i>Pseudochrobactrum</i>	

### Análise estatística

Foram calculadas as médias de ocorrência por micro-organismo, por esfera de fiscalização: Municipal, Estadual e Federal. Em sequência, foram calculadas as medianas globais por cada esfera de Inspeção e aplicado o teste de *Kruskal Wallis* comparando os 3 níveis de fiscalização, seguido do teste de *Tukey* para identificar os pares com diferenças significativas.

Para os queijos municipais, os únicos com restrição de produção e circulação em seus municípios de origem, foram ainda calculadas medianas de detecção por cidade (Erechim ou Passo Fundo). Tais medianas foram comparadas pela aplicação do Teste de *Mann-Whitney*.

### RESULTADOS

Foram identificados micro-organismos pertencentes a quatro filos microbianos e 109 gêneros distintos, ou seja, para todos os 109 gêneros bacterianos pesquisados, pode ser detectada ao menos uma sequência genética quando tomado todo o universo avaliado. Dentre esses, 11 pertenciam ao filo Acinetobacteria, 13 ao filo Bacteroidetes, 27 ao filo Firmicutes e 58 ao filo Proteobacteria.

Como critério de análise, fixou-se como ponto de corte a identificação de pelo menos a notação de 10<sup>1</sup> sequências detectadas, determinando assim os resultados de maior relevância de acordo com os valores encontrados. Tomando tal critério, foram destacados 31 gêneros bacterianos. Tais micro-organismos são apresentados na Tabela 2, sendo divididos em 9 gêneros considerados naturais às amostras lácteas ou não patogênicos, e 22 patogênicos ou prejudiciais à tecnologia do leite. Dentre esses 22, os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* foram os que ocorreram em 100% dos queijos analisados (12/12), independente do município em que foram coletados ou do serviço de Inspeção responsável pela fiscalização de sua produção.

Tabela 2. Gêneros bacterianos detectados por metagenômica, de forma notória (detecção mínima de 10<sup>1</sup> sequências genéticas), em queijos tipo Colonial, submetidos a níveis de Inspeção Municipal, Estadual ou Federal, coletados nos municípios de Erechim e Passo Fundo, estado do Rio Grande do Sul

Grupo	Gêneros
Benéficos à tecnologia de produção láctea	<i>Carnobacterium</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Cobetia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Streptococcus</i> .
Prejudiciais à tecnologia do leite	<i>Arthrobacter</i> , <i>Macroccoccus</i> , <i>Buttiauxella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Epilithonimonas</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Kurthia</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Tiedjeia</i> .
Com potencial patogênico para a saúde pública	<i>Brochothrix</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Vibrio</i> .

À análise descritiva dos dados, *Pseudomonas* spp. obteve a maior mediana dentre todos os micro-organismos detectados, seguida de *Bacillus* spp. e *Acinetobacter* spp. Ainda dentro

do critério de corte determinado, pode-se destacar micro-organismos de grande importância em Saúde Pública, tais como aqueles pertencentes à Família Enterobacteriaceae (gêneros *Escherichia* e *Klebsiella*) e o gênero *Staphylococcus*.

Vale destacar que, apesar de identificados em níveis abaixo do ponto de corte deste estudo, outros gêneros de importância em Saúde Pública tiveram ao menos uma sequência genética detectada. Esses foram *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp., ambos com uma detecção em amostra de queijo sob Inspeção Municipal em Erechim.

Quanto às esferas de fiscalização, notou-se maior mediana de detecção de sequências de DNA microbiano em nível Municipal (12,88), seguida do âmbito Federal (2,88) e por último o Estadual (2,13). À aplicação do teste de Kruskal Wallis para comparação dos 3 níveis de fiscalização, não foram identificadas diferenças significativas ( $P_{KW}=0,10$ ), porém quando da avaliação por pares por meio do teste de Tukey, evidenciou-se diferença estatística entre as esferas Municipal e Federal ( $P_T= 0,03$ ). Demais comparações não revelaram valores de P significativos, tanto entre âmbitos municipal e estadual ( $P_T= 0,52$ ), como entre estadual e federal ( $P_T= 0,23$ ).

Em relação aos queijos municipais, não foi identificada diferença significativa à aplicação do teste de Teste de Mann-Whitney ( $P_{MW}= 0,09$ ).

## DISCUSSÃO

Em relação à diversidade microbiológica associada às sequências genéticas detectadas e aos 4 Filos bacterianos identificados, Verdier-Metz et al. (8) evidenciaram os mesmos Filos, Acinetobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria, a partir de cultura e sequenciamento genético quando do estudo da microbiota da pele do teto de vacas, sugerindo no referido estudo, a pele do teto como um potencial fonte microbiológica do leite utilizado na produção de queijos.

Dentre os gêneros bacterianos identificados, pode-se observar aqueles de grande importância em Saúde Pública, com destaque para os gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus*. De fato, *Acinetobacter* spp. é um patógeno de transmissão alimentar (9), sendo também reconhecido como o maior gênero de envolvimento em infecções nasocomiais (10). Já para o gênero *Bacillus*, há o grupo *Bacillus cereus*, composto por diversas espécies incluindo aquelas associadas a intoxicações alimentares (11). Tanto *Bacillus* spp., como *Clostridium* spp., também destacado nos resultados deste estudo, são bacilos gram positivos esporulados, termorresistentes. Nesse sentido, a espécie *B. subtilis* é uma das bactérias mais frequentemente encontrada no leite, pois pode resistir ao processo de pasteurização (12). Para o gênero *Clostridium*, além de sua importância em Saúde Pública, faz-se necessário destacar a espécie *Clostridium tyrobutyricum*, capaz de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis, de forma a ser também prejudicial à qualidade do queijo (13).

Quanto às enterobactérias destacadas nos resultados (gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Salmonella*), esses micro-organismos são bacilos gram negativos sensíveis à alta temperatura, sendo destruídos na pasteurização do leite (12). Dessa forma, a simples detecção de DNA bacteriano, associado ao fato de que, em tese, os queijos analisados foram produzidos com leite pasteurizado, sugerem no mínimo contaminação anterior ao processamento térmico, de modo que para se verificar uma possível contaminação posterior ou pasteurização insuficiente, seria necessária avaliação de viabilidade bacteriana, com confecção de cultura microbiológica. Especificamente para coliformes, sua identificação em alimentos pode indicar o processamento inadequado ou contaminação pós-processamento, tendo como causas principais o uso de matérias-primas contaminadas, equipamentos mal higienizados ou deficiências higiênicas durante a manipulação do produto (14).

Nesse mesmo sentido, vale salientar a detecção de *Staphylococcus* spp.. Tal coco Gram positivo, quando em concentrações maiores que  $10^5$  UFC/mL-1 no leite, aumenta os riscos de produção de enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis, podendo provocar intoxicação alimentar (12). De fato, Borges et al. (15), demonstraram a persistência de enterotoxinas estafilocócicas após o processo de pasteurização do leite, permanecendo conseqüentemente no queijo como risco ao consumidor, além de sugerirem também contaminação por manipuladores na linha de produção devido a deficiências em Boas Práticas de Fabricação (15).

Quanto às bactérias prejudiciais à tecnologia do leite, a maior mediana foi associada a *Pseudomonas* spp. Tal gênero é composto por bactérias psicrófilas que são capazes de se reproduzir sob temperatura de refrigeração, sendo *P. fluorescens* responsável pela produção de proteases e lipases termorresistentes capazes de deteriorar produtos lácteos industrializados (12).

À análise de associação entre os Sistemas de Inspeção, a diferença significativa evidenciada entre os queijos sob Inspeção Municipal e Federal, com maior mediana na primeira esfera citada, sugere melhor qualidade microbiológica do queijo e/ou leite utilizado como matéria-prima da produção submetida à Inspeção Federal. Quanto ao comparativo dos queijos municipais, a ausência de diferença significativa sugere equivalência entre os sistemas municipais avaliados (Erechim e Passo Fundo).

## CONCLUSÕES

Foi identificado DNA de micro-organismos pertencentes a quatro filos microbianos: Acinetobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria.

Quanto aos tipos bacterianos envolvidos, os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* ocorreram em 100% das amostras avaliadas. Outras bactérias de importância em Saúde Pública, como as pertencentes à Família Enterobacteriaceae e o gênero *Staphylococcus* foram detectados.

A análise de medianas de detecção e da associação entre os sistemas de fiscalização sugere melhor qualidade microbiológica do queijo, e/ou leite utilizado como matéria-prima, pertencentes à produção submetida à Inspeção Federal em relação à Municipal, assim como equivalência entre os serviços municipais.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira MN. Tecnologia de produtos funcionais. São Paulo: Editora Atheneu; 2009.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2016 [cited 2018 Sept 20]. Available from: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2016\\_v44\\_br.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf)
3. Abrahão RMCM, Nogueira PA, Malucelli MIC. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: Um problema de saúde pública. Arch Vet Sci. 2005;10(2):1-17. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v10i2.4409>.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de Março de 2017, alterado pelo Decreto nº 9.069, de 31 de Maio de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) [Internet].

- Brasília: MAPA; 2017 [cited 2018 Sept 20]. Available from: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm)
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de Março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos [Internet]. Brasília: MAPA; 1996. Available from: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>
  6. Evangelista-Barreto NS, Santos GCF, Souza JS, Bernardes FS, Silva IP. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e *estafilococos* coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. *Rev Bras Hig Sanidade Anim* [Internet]. 2016 [cited 2018 Sept 20];10(1):55-67. Available from: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/301/1457>
  7. Escobar-Zepeda A, de León AV, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Front Genet*. 2015;6(348):1-15. doi: 10.3389/fgene.2015.00348.
  8. Verdier-Metz I, Gagne G, Bornes S, Monsallier F, Veisseire P, Delbès-Paus C, et al. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(2):326-33. doi: 10.1128/AEM.06229-11.
  9. Saad N, Amin W, Mostafa S. Detection of *Acinetobacter* species in milk and some dairy products. *Assiut Vet Med J* [Internet]. 2018 [cited 30 Jul 2018];64(156):34-40. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/333853143\\_DETECTION\\_OF\\_ACINETOBACTER\\_SPECIES\\_IN\\_MILK\\_AND\\_SOME\\_DAIRY\\_PRODUCTS](https://www.researchgate.net/publication/333853143_DETECTION_OF_ACINETOBACTER_SPECIES_IN_MILK_AND_SOME_DAIRY_PRODUCTS)
  10. Almasaudi SB. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol*. 2018;25(3):586-96. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.009.
  11. Rossi GAM, Aguilar CEG, Silva HO, Vidal AMC. *Bacillus cereus* group: genetic aspects related to food safety and dairy processing. *Arq Inst Biol*. 2018;85:e0232017. doi: 10.1590/1808-1657000232017.
  12. Menezes MFC, Simeoni CP, Etchepare MA, Huerta K, Bortoluzzi, DP, Menezes C. Microbiota e conservação do leite. *REGET - Rev Eletronica Gest Educ Tecnol Ambient*. 2014;18(5):76-89. doi: 10.5902/2236117013033.
  13. Skeie S. Milk quality requirements for cheesemaking. In: Griffiths MW, editor. *Improving the safety and quality of milk*. Cambridge: Woodhead Publishing; 2010. p.433-53. doi: 10.1533/9781845699437.3.432.
  14. Araújo RABM. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá [dissertação] [Internet]. Viçosa: UFV; 2004 [cited 2018 Jul 14]. Available from: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9041>

15. Borges MF, Nassu RT, Pereira JL, Andrade APC, Kuaye AY. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc Rural*. 2008;38(5):1431-8. doi: 10.1590/S0103-84782008000500037.

**Recebido em: 28/05/2020**

**Aceito em: 15/02/2021**