



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DO AMBIENTE**

**JULIANA FONSECA MOREIRA DA SILVA**

**DETECÇÃO DE *Staphylococcus* sp. NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO  
QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO EM PALMAS E  
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA FRENTE A DIFERENTES  
DROGAS ANTIMICROBIANAS**

**PALMAS**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JULIANA FONSECA MOREIRA DA SILVA**

**DETECÇÃO DE *Staphylococcus* sp. NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO  
QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO EM PALMAS E  
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA FRENTE A DIFERENTES  
DROGAS ANTIMICROBIANAS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin  
Co-Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Jovita Eugênia Gazzinelli  
Cruz Madeira

**PALMAS**

**2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Palmas**

S586d Silva, Juliana Fonseca Moreira  
Detecção de *Staphylococcus* sp. no processo de produção do queijo Minas frescal comercializado em Palmas e caracterização do perfil de resistência frente a diferentes drogas antimicrobianas /Juliana Fonseca Moreira da Silva – Palmas, 2007.  
119 p..

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Tocantins, Curso de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente, 2007.**

Orientador: Prof<sup>º</sup> Dr<sup>º</sup> Aparecido Osdimir Bertolin.

1. *Staphylococcus* 2. Queijo 3. Leite 4. Manipuladores 5. Ordenhadores, 6. Enterotoxinas, 7. Antibiótico. I. Título.

**CDU 504**

**Bibliotecário: Paulo Roberto Moreira de Almeida  
CRB-2 / 1118**

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS** – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (**Lei nº 9.610/98**) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**JULIANA FONSECA MOREIRA DA SILVA**

**DETECÇÃO DE Staphylococcus sp. NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO  
QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO EM PALMAS E  
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA FRENTE A DIFERENTES  
DROGAS ANTIMICROBIANAS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-graduação em Ciências do Ambiente, da Universidade Federal do Tocantins, pela seguinte banca examinadora:

---

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin  
Prof. do Curso de Ciências Biológicas  
Fundação Universidade Federal do Tocantins – UFT

---

Dr. Guilherme Prado  
Pesquisador da Fundação Ezequiel Dias - IOM

---

Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim  
Prof. do Curso de Engenharia de Alimentos  
Fundação Universidade Federal do Tocantins – UFT

Palmas, 25 de março de 2008.

**Dedicatória**

As minhas filhas Luiza e Julia pelo amor incondicional, pelos carinhos muitas vezes não correspondidos e por saber perdoar a minha ausência na realização deste trabalho. Obrigado vocês por tornarem os meus dias muito mais felizes. AMO VOCÊS.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter iluminado o meu caminho com a sua luz.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin, pelo profissionalismo e competência, que contribuiu para o andamento deste estudo. Sou grata pela orientação acadêmica deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

A minha orientadora Dra. Jovita E. Gazzinelli Cruz Madeira pela sua competência, ensinamentos, carinho e amizade demonstrados durante nosso convívio. OBRIGADA por escutar minhas dúvidas, angústias e alegrias. O seu apoio foi fundamental.

Aos proprietários das fazendas A e B, sem a ajuda de vocês este trabalho não seria possível.

Aos meus pais que, mesmo de longe, me deram força e determinação, me impulsionando para estar onde estou. OBRIGADA pela demonstração de amor e carinho a cada telefonema.

A minha família, em especial ao meu marido, obrigada pelo incentivo, apoio e a contínua troca de informações.

Agradeço ao Dr. Ricardo Souza Dias que, apesar da distância e de suas atividades, não deixou de cooperar com a pesquisa e soube de forma amigável orientar alguns dos passos mais importantes deste trabalho.

Aos professores Paula Benevides Moraes e Raphael Sanzio Pimenta, pelo consentimento para a utilização do espaço físico, equipamentos e insumos de seu laboratório.

A Hyana obrigada pela sua ajuda incansável, amizade e convívio, principalmente nas coletas e nos finais de semana que passamos juntas. VALEU!!!!

A Cristiane (técnica do LAMBIO) pelo auxílio, colaboração, amizade e convívio nesta jornada.

A Fundação Ezequiel Dias - FUNED por me acolher no momento em que precisei.

A Gláucinha, Bárbara, Nayara, Dany e Elizete, não sei como posso agradecer. O esforço de vocês foi fundamental. OBRIGADA!!!!

A Maria José de Sena pelo incentivo e ajuda no início desse trabalho, sinto saudades dos tempos que trabalhamos juntas.

Ao Felipe, Isabel, Letícia e Thaysa pela ajuda na execução de parte desse trabalho e por algumas dicas.

Ao curso de mestrado de Ciências do Ambiente por me proporcionar esta chance de crescimento

Aos professores do Mestrado em Ciências do Ambiente, pelos conhecimentos passados.

Aos colegas de mestrado, fica aqui a saudade da nossa convivência.

As amigas Patrícia, Meire, Mary, Ilda e Luana em especial a Gisele e Emilia por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A Silvia psicóloga e amiga, por permitir que todas as minhas angústias fossem liberadas e pela ajuda na busca da felicidade. Você que foi fundamental para que pudesse conciliar estudo, filhas e marido.

Aos meus avós pela bela educação que deram aos meus pais permitindo desta forma que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos obrigada.

A minha saudosa Dinha pela sua grande sabedoria e experiência de vida, sei que onde estiver estará torcendo por mim.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do trabalho.

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1 LEITE BOVINO NO BRASIL .....	5
2.2 QUEIJO .....	9
2.2.1 Histórico.....	9
2.2.2 Queijo Minas frescal .....	10
2.3 MANIPULADOR .....	12
2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS .....	15
2.5 <i>Staphylococcus</i> sp. ....	20
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.6 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS .....	26
2.7 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1 CEPA DE REFERÊNCIA .....	35
3.2 AMOSTRAGEM.....	35
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	39
3.3.1 Isolamento e identificação bioquímica de <i>S. aureus</i> .....	39
3.3.1.1 Preparo da amostra.....	39
3.3.1.2 Isolamento e enumeração de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	40
3.3.2 Identificação bioquímica do microrganismo .....	40
3.3.2.1 Prova da Catalase .....	41
3.3.2.2 Prova da Coagulase .....	41

3.3.2.3 Prova da Termonuclease (TNase).....	42
3.3.2.4 Prova da Hemólise.....	43
3.3.2.5 Fermentação de Açúcares.....	44
3.3.3 Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas.....	45
3.3.3.1 Detecção de enterotoxinas pelo Método de OSP.....	46
3.3.3.2 Detecção de enterotoxinas pelo método ELFA.....	47
3.3.4 Avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.....	49
3.3.5 Elaboração da cartilha.....	50
3.3.6 Análise dos resultados.....	50
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
4.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> sp. ISOLADAS DO LEITE <i>IN NATURA</i> E LEITE PASTEURIZADO.....	52
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> sp. ISOLADAS DOS MANIPULADORES E ORDENHADORES.....	56
4.3 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> sp. ISOLADAS DO QUEIJO MINAS FRESCAL.....	60
4.4 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ENTEROTOXINAS E DA TOXINA DA SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL.....	68
4.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS.....	71
4.6 ELABORAÇÃO DA CARTILHA CONTENDO BOAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO E FABRICAÇÃO DOS DERIVADOS DO LEITE.....	75
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Freqüência de <i>Staphylococcus</i> sp. isolados de leite <i>in natura</i> nas propriedades “A” e “B”.....	52
<b>Tabela 2.</b> Enumeração das espécies de <i>Staphylococcus</i> (UFC/mL) em amostras de leite <i>in natura</i> isoladas das propriedades “A” e “B” .....	53
<b>Tabela 3.</b> Freqüência de isolamento de espécies de <i>Staphylococcus</i> em diferentes sítios do manipulador e ordenhadores da propriedade “A”. .....	57
<b>Tabela 4.</b> Freqüência de isolamento de espécies de <i>Staphylococcus</i> em diferentes sítios do manipulador e dos ordenhadores da propriedade “B”.....	58
<b>Tabela 5.</b> Freqüência de <i>Staphylococcus</i> sp. isolados de queijos frescal produzidos nas propriedades “A” e “B”.....	61
<b>Tabela 6.</b> Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. em amostras de queijo Minas frescal nas propriedades “A” e “B”.....	63
<b>Tabela 7.</b> Enumeração das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em amostras de queijo Minas frescal produzidos nas propriedades “A” e “B”. .....	64
<b>Tabela 8.</b> Detecção de enterotoxinas pelos métodos OSP e ELFA a partir do queijo Minas frescal produzido nas propriedades “A” e “B”. .....	68
<b>Tabela 9.</b> Pool das cepas de <i>S.aureus</i> isolados do leite, ordenhadores, manipuladores, e do queijo das propriedades “A” e “B” e o perfil de resistência a doze antibióticos. ....	74

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Freqüência de <i>Staphylococcus</i> sp. isolados em amostras de queijo nas propriedades analisadas. ....	62
<b>Gráfico 2.</b> Percentagem de cepas de <i>S. aureus</i> isolados da linha de produção do queijo Minas frescal produzidos pelas propriedades “A” e “B”, diante do perfil de resistência aos antibióticos (tetra = Tetraciclina, trim-sulf = Trimetropim – sulfametoxazol, oxa = Oxacilina, clin = Clindamicina, eri = Eritromicina, van = Vancomicina, gen = Gentamicina, pen = Penicilina, cefox = Cefoxitina, amp = Ampicilina, cefa = Cefalotina, rifam = Rifampicina). ....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Propriedade “A” - Local da ordenha, a seta indica o local de coleta do leite. .....	36
<b>Figura 2.</b> Propriedade “A” - Local de manipulação dos queijos. ....	36
<b>Figura 3.</b> Processo de fabricação do queijo Minas frescal na Propriedade “A”. a- filtragem do leite; b- adição do coalho + salga; c- 1ª corte da coalhada; d- 2ª corte da coalhada; e- retirada do soro; f- enformagem; g- prensagem; h- queijo pronto para comercializar.....	37
<b>Figura 4.</b> Propriedade “B” - chegada do leite de outra propriedade em galões após a ordenha.....	37
<b>Figura 5.</b> Processo de fabricação do queijo Minas frescal na Propriedade “B”. a - início da pasteurização; b- pasteurização; c- filtragem; d- adição do cloreto de cálcio; e- 1º corte da coalhada; f- 2º corte da coalhada; g- retirada do soro; h- enformagem; i- queijo pronto para comercialização.....	38
<b>Figura 6.</b> Colônias típicas de <i>S. aureus</i> em ágar BP .....	40
<b>Figura 7.</b> Prova da catalase : a- reação positiva; b- reação negativa .....	41
<b>Figura 8.</b> Prova da coagulase: a- reação positiva; b- reação negativa .....	42
<b>Figura 9.</b> Prova da TNase: a- reação positiva; b- reação negativa .....	43
<b>Figura 10.</b> Prova da hemólise: a- controle negativo; b- cepas positivas.....	44
<b>Figura 11.</b> (A) Prova bioquímica da FAM manitol: a- reação positiva; b- reação negativa / (B) FAM maltose: a- reação positiva; b- reação negativa .....	45
<b>Figura 12.</b> Molde segundo o “Food Research Institute” usado no teste de OSP (medidas em mm). ....	46
<b>Figura 13.</b> Placa utilizada para realização do teste OSP, mostrando orifícios: 1 e 4 – toxina padrão; 7- anti-toxina; 2, 3, 5 e 6 – amostras positivas para a enterotoxina testada. ....	47
<b>Figura 14.</b> Barretes utilizados para a técnica ELFA no aparelho mini-VIDAS (bioMérieux) .....	48
<b>Figura 15.</b> Aparelho mini-VIDAS, localização dos barretes e dos cones: A- barretes; B- cones.....	48

<b>Figura 16.</b> Representação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos .....	50
<b>Figura 17.</b> Processo de fabricação do queijo Minas frescal produzido na propriedade “A” .....	66
<b>Figura 18.</b> Processo de fabricação do queijo Minas frescal produzido na propriedade “B” .....	66

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> – Fórmulas dos meios de cultura.....	88
<b>Anexo 2</b> – Interpretação do diâmetro da zona de inibição para os antibióticos utilizados .....	93
<b>Anexo 3</b> – Cartilha do Manipulador de derivados do leite .....	94
<b>Anexo 4</b> – Trabalho publicado .....	111

**LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS**

%	— Porcentagem (por cento)
µg	— Micrograma
µl	— microlitros
µm	— Micrometros
½	— Meio
Aa	— Atividade de água
ANVISA	— Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APC	— Células apresentadoras de antígenos
APPCC	— Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle
ATCC	— American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	— <i>Bacillus cereus</i>
BHI	— Caldo infuso de cérebro – coração
BP	— Ágar Baird- Parker
BPF	— Boas Práticas de Fabricação
CAPES	— Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDC	— Center for Disease Control and Prevention
CE	— Ceará
CLSI	— Clinical and Laboratory Standards Institute
DIVISA	— Divisão de Vigilância Sanitária
DNA	— Ácido desoxirribonucléico
DTA	— Doença transmitida por alimento
<i>E. coli</i>	— <i>Escherichia coli</i>
EDTA	— Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELFA	— Enzyme Linked Fluorescent Assay
ELISA	— Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
EMBRAPA	— Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura
EPAMIG	— Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

ET-A	— Toxina epidermolítica A
ET-B	— Toxina epidermolítica B
EUA	— Estados Unidos da América
FAM	— Fermentação aeróbia de manitol ou maltose
FUNED	— Fundação Ezequiel Dias
g	— Gramas
h.	— Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	— Peróxido de hidrogênio
HCl	— Ácido clorídrico
hs.	— Horas
HTST	— High Temperature Short Time
IMA	— Instituto Mineiro de Agropecuária
IOM	— Instituto Octávio Magalhães
K	— Potássio
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub>	— Telurito de potássio
Kg	— Kilogramas
<i>L. monocytogenes</i>	— <i>Listeria monocytogenes</i>
LEA	— Laboratório de Enterotoxina
LTLT	— Low Temperatura Large Time
M	— Molaridade (Molar)
<i>mecA</i>	— Gene de resistência a meticilina
Met	— Metodologia
MG	— Minas Gerais
MHC	— Complexo Maior de Histocompatibilidade
min.	— Minutos
mL	— Mililitros
mm	— Milímetros
MRSA	— <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina
MS	— Ministério da Saúde
MT	— Mato grosso

N	— Normalidade (Normal)
Na	— Sódio
NaCl	— Cloreto de sódio
NaOH	— Hidróxido de sódio
NCBI	— National Center for Biotechnology Information
NCCLS	— National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	— Nanogramas
nm	— nanômetros
°C	— Graus celsius (centígrados)
OMS	— Organização Mundial de Saúde
OPAS	— Organização Pan-Americana da Saúde
OSP	— Sensibilidade Ótima em Placa
p/v	— Peso por volume
PBP	— Penicillin-Binding Protein
PBS	— Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato)
PCR	— Reação em cadeia da polimerase
PFGE	— Pulsed-field gel electrophoresis
pH	— Potencial Hidrogeniônico
POP	— Procedimento Operacional Padrão
RDC	— Resolução da Diretoria Colegiada
RFV	— Valor Relativo da fluorescência
rpm	— Rotação por minuto
<i>S. aureus</i>	— <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	— <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. hyicus</i>	— <i>Staphylococcus. hyicus</i>
<i>S. intermedius</i>	— <i>Staphylococcus intermedius</i>
<i>S. saprophyticus</i>	— <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
SCO-	— <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
SCO+	— <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SE	— Enterotoxina

SEA	— Enterotoxina tipo A
SEB	— Enterotoxina tipo B
SEC	— Enterotoxina tipo C
SED	— Enterotoxina tipo D
SEE	— Enterotoxina tipo E
SEG	— Enterotoxina tipo G
SEH	— Enterotoxina tipo H
SEI	— Enterotoxina tipo I
SEJ	— Enterotoxina tipo J
SEK	— Enterotoxina tipo K
SEL	— Enterotoxina tipo L
SEM	— Enterotoxina tipo M
SEN	— Enterotoxina tipo N
SEO	— Enterotoxina tipo O
SEP	— Enterotoxina tipo P
SEQ	— Enterotoxina tipo Q
SER	— Enterotoxina tipo R
SET- EIA	— Enzyme Linked-Immunosorbent Assay
SET- RPLA	— Aglutinação em látex de fase reversa
SEU	— Enterotoxina tipo U
SIF	— Serviço de Inspeção Federal
SIH	— Sistema de Informações Hospitalares
SIM	— Sistema de Informação sobre Mortalidade
SNC	— Sistema Nervoso Central
SP	— São Paulo
<i>St.</i>	— <i>Streptococcus</i>
TCR	— Células T receptoras de antígenos
TNAse	— Termonuclease
TO	— Tocantins
TSA	— Ágar triptona de soja

TSB	— Caldo triptona de soja
TSST-1	— Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
U	— Unidades
UFC	— Unidades Formadora de Colônias
UFT	— Universidade Federal do Tocantins
v/v	— Volume por volume
vanA	— Gene de resistência a teicoplanina e vancomicina
VISA	— <i>S. aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VT	— Valor do teste

## RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da investigação da ocorrência de *Staphylococcus aureus* no processo de produção de queijo Minas frescal produzidos e comercializados em duas pequenas propriedades rurais em Palmas-TO. Foi avaliada a contaminação durante o processo de produção do queijo frescal no período de novembro de 2006 a abril de 2007, sendo realizadas análises microbiológicas de três coletas do leite *in natura* e pasteurizado, produto final (queijo) além de swabs das fossas nasais e leitos subungueais dos ordenhadores e manipuladores. Todas as amostras de leite *in natura* revelaram a presença de *S. aureus*, sendo que na propriedade “A” a contagem média foi de  $10^5$  UFC/mL. Na propriedade “B” foram registradas contagens de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL (resultados para amostra indicativa). Não foi observado crescimento de *Staphylococcus* sp. no leite pasteurizado proveniente da propriedade “B”. Todos os queijos apresentaram contagem de *Staphylococcus* sp. superior a  $5 \times 10^2$  UFC/g. Em relação a investigação de enterotoxinas, todas as amostras foram positivas para a presença da enterotoxina tipo A (SEA), pela metodologia de Sensibilidade ótima em placa (OSP). Por outro lado, não foram detectadas enterotoxinas pela metodologia “Enzyme Linked Fluorescent Assay” (ELFA). Foram detectados a presença de *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase positiva em todos os sítios amostrados (fossas nasais e leitos subungueais) de todos os ordenhadores e manipuladores do queijo. Quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos observou-se, de um modo geral, um maior percentual de cepas resistentes a eritromicina (64%), penicilina (36%) e ampicilina (32%). A maior sensibilidade foi observada para a gentamicina (100%), tetraciclina e cefoxitina (ambas com 96 %). A gentamicina demonstrou, neste estudo, ser o antibiótico de maior efetividade frente *Staphylococcus aureus* isolados das amostras analisadas. Os resultados indicam que os queijos são impróprios para o consumo humano por apresentar enterotoxina estafilocócica e *Staphylococcus* coagulase positiva em contagens superiores ao estabelecido pela Legislação vigente. Estes resultados indicam possíveis falhas nas etapas de seleção de matéria prima, fabricação e transporte do produto. Sendo assim, podemos afirmar que estes produtos apresentam um possível risco à saúde do consumidor.

**Palavras chave:** *Staphylococcus*, queijo, leite, manipuladores, ordenhadores, TSST-1, enterotoxinas, antibiótico.

## ABSTRACT

This paper presents the results of an investigation of the occurrence of *Staphylococcus aureus* in the process of production of Minas frescal cheese in two small rural properties in Palmas – TO. We evaluated the contamination during the manufacturing process in in the period from November 2006 to April 2007. Microbiological analyses of three sampling collections included *in natura* milk, pasteurized milk, and final product (cheese), together with swab samples of nasofaringeal and subungueal sites of milkers and manufacturers. All samples from *in natura* milk revealed the presence of *S. aureus*, from  $10^5$  CFU/mL in property A to  $10^6$  -  $10^7$  CFU/mL in property B (results recorded for indicator sample). No growth of *Staphylococcus* sp. was observed in pasteurized milk from property B. All cheese samples presented counts of *Staphylococcus* sp. higher than  $5 \times 10^2$  CFU/g, and were positive for enterotoxin A (SEA) by the methodology of Optimal Sensibility on Plate (OSP). On the other hand, no enterotoxins were detected by the Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA). All samples from milkers and manufacturers presented *S. aureus* or *Staphylococcus* coagulase positive in sites sampled (nasofarigeal and subungueal sites). The profile for drug resistance showed a general higher perceptual of strains resistant to eritomicin (64%), penicilin (36%) and ampicilin (32%). The highest sensibility was observed for gentamicin (100%), tetraciclin and cefoxitin (96 % for both). Gentamicin has demonstrated to be the most effective antimicrobial drug against the *Staphylococcus aureus* isolated from the samples under study. The results indicate that cheese are improper for human consumption because they present staphylococal enterotoxin and *Staphylococcus* coagulase positive in counts higher than that proposed by legal regulation indicating possible failure in the selection of materials, manufacturing and transportation that may cause public health problems as they constitute a possible risk to the consumers healths.

**Keywords:** *Staphylococcus*, cheese, milk, handlers, manufacturers, TSST-1, enterotoxins, , antibiotic.

## 1 INTRODUÇÃO

Devido ao grande número de casos de infecções e intoxicações em humanos e animais, causadas por *Staphylococcus aureus*, muitos antibióticos têm sido utilizados como medida de tratamento e controle deste microrganismo. No entanto, a ocorrência de linhagens resistentes tem sido registrada desde a introdução da meticilina na terapêutica de infecções estafilocócicas. Desde o início da década de 60, vem ocorrendo um aumento constante de isolados denominados MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), o que tornou-se um problema sério para a saúde pública mundial. Esta resistência não se limitou apenas a meticilina. Recentemente no Brasil, foram isolados estafilococos resistentes também ao grupo dos glicopeptídeos (vancomicina e a teicoplanina), sendo estes, considerados antibióticos de última geração para o tratamento de infecções de origem estafilocócicas (TSEN et al., 1998; SOUZA et al., 2005).

A ocorrência de intoxicações de origem alimentar é uma realidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Muito embora a maioria dos casos sejam considerados como leves e moderados, algumas infecções mais graves podem causar seqüelas e até mesmo óbito, além de gastos hospitalares, afastamento de atividades profissionais e escolares. Estima-se que somente nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de 1 a 2 milhões de pessoas são acometidas anualmente por intoxicação alimentar provocada por toxinas de *S. aureus* presentes principalmente em produtos de origem animal (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Segundo dados do Ministério da Saúde (2005), no Brasil, no período de 1999 a 2004 foram registrados 3.410.048 internações por intoxicação alimentar. São vários os fatores que contribuem para estes surtos. Dentre eles, pode-se citar: matéria-prima de qualidade insatisfatória, má higienização dos equipamentos e utensílios, manipuladores sem conhecimentos básicos de higiene, além de acondicionamento em temperatura e condições insatisfatórias nos pontos de distribuição e comercialização (CÂMARA, 2002).

Diversos estudos têm evidenciado a ocorrência de intoxicações alimentares resultantes do consumo de alimentos de origem animal. De acordo com dados apresentados por Van Anson (2005), os surtos de enfermidades de origem alimentar

vêm aumentando a cada ano, sendo os *S. aureus* um dos agentes bacterianos mais envolvidos nestes surtos. No Brasil, vários trabalhos indicaram uma alta contaminação do leite *in natura* e queijos por bactérias do gênero *Staphylococcus*, inclusive amostras associadas a surtos de intoxicação alimentar (SABIONI et al., 1988; GOMES e GALLO, 1995; SENA, 2000; LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; ASSUMPÇÃO et al., 2003; LEITE et al., 2005; ORNELAS, 2005; TEMELLI et al., 2005; SALOTTI et al., 2006).

Le Loir et al. (2003), observaram que esta bactéria permanece como uma das principais causas de intoxicação alimentar por contaminar os alimentos durante a sua preparação e processamento, principalmente alimentos que requerem manipulação como o queijo.

Os *Staphylococcus* são responsáveis por mais de 80 % das infecções supurativas em humanos, sendo a segunda causa mais freqüente de infecções hospitalares, ficando atrás somente de *Escherichia coli*. São também responsáveis pela grande maioria das mastites bovinas, podendo, desta forma, contaminar o leite desde a sua obtenção durante a ordenha ou ainda comprometer a qualidade de diversos produtos lácteos derivados (STEPHAN et al., 2001).

O leite é um dos alimentos mais completos, devido a sua composição rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas (FRANCO et al., 2000). Este alimento, ao sair do úbere, possui uma microbiota viável de 500 a 1.000 células/mL, constituída por micrococos e bacilos não patogênicos (SENA, 2000). No entanto, a qualidade do leite assume destacada importância para a saúde pública. No Brasil, as estatísticas disponíveis sobre o assunto descrevem que 6,4 % dos casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), estão associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos a partir do leite contaminado com microrganismos patogênicos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Segundo Sena (2000), esta contaminação inicia-se nas fazendas, durante ou após a ordenha, sendo resultado de deficiências da higienização do meio ambiente, utensílios, doenças do rebanho e humanos. As dificuldades de transporte e as falhas durante os processos de beneficiamento e estocagem do leite, também interferem na sua qualidade final.

O leite, por possuir um elevado valor nutritivo torna-se um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis e indesejáveis. Entre os microrganismos indesejáveis estão aqueles que deterioram o leite e seus derivados,

interferindo diretamente no valor nutritivo e na qualidade sensorial dos mesmos. Existem também, aqueles responsáveis por toxinfecções alimentares, colocando em risco a saúde dos consumidores, como por exemplo: *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Destes, a intoxicação por *Staphylococcus* tem sido considerada uma das mais comuns em todo o mundo, e é provavelmente a mais freqüente, devido a produção de enterotoxinas (CARMO e BERGDOLL, 1990).

O queijo Minas apresenta considerável importância na saúde pública, dada as suas condições peculiares de produção. A utilização do leite *in natura* para a fabricação deste tipo de queijo é motivo de preocupação, pois pode constituir uma importante via de transmissão de inúmeros patógenos, sendo o queijo um dos alimentos mais envolvidos na veiculação de intoxicações alimentares (BORELLI, 2002).

Existem vários fatores relacionados com a elevada freqüência de *Staphylococcus* em queijos. Um deles seria a grande concentração destes microrganismos no leite *in natura* (PEREIRA et al., 1991). De acordo com Santos et al. (1995), outros fatores, tais como condições higiênicas deficientes no local de ordenha do leite e fabricação do queijo, utilização de temperatura inadequada durante o transporte, armazenamento e comercialização do produto e os manipuladores que podem albergar a bactéria principalmente na nasofaringe e pele, contribuem para a contaminação do produto. Os queijos tipo frescal, devido as suas características de identidade e tecnologias, são alimentos que apresentam elevados risco de veiculação de toxinfecção. Somente nos últimos anos estas intoxicações têm despertado a atenções dos órgãos oficiais de saúde pública em diversas cidades do Brasil (CARMO e BERGDOLL, 1990).

Sabe-se que uma importante fonte de microrganismos para os alimentos é o manipulador que entra em contato com os mesmos em toda a cadeia de produção. Vários procedimentos e sistemas de qualidade visam minimizar a contaminação dos alimentos, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC). No entanto, vários estudos têm demonstrado que a principal fonte de *S. aureus* para o queijo Minas frescal pode ser a matéria-prima de má qualidade e não apenas os manipuladores como geralmente tem-se pensado (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Com base nestes fatos, o conhecimento da origem da contaminação por *S. aureus* no queijo Minas frescal, um produto muito consumido em todo território brasileiro, possibilitará o estabelecimento de medidas sanitárias mais eficientes para minimizar a contaminação por esta bactéria, nestes alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

No entanto, não existem dados disponíveis na literatura consultada junto ao portal de periódicos da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), sobre a qualidade do queijo Minas frescal produzido artesanalmente no Estado do Tocantins, fator primordial para a implementação de políticas que visem a melhoria da qualidade do produto. Este estudo pretende fornecer conhecimentos básicos sobre a qualidade dos queijos provenientes de duas pequenas propriedades rurais situadas na região de Palmas – TO.

O objetivo básico deste estudo é: o isolamento e identificação das cepas de *Staphylococcus aureus* presentes no processo de fabricação de queijos comercializados nas feiras livres de Palmas – TO, a detecção de enterotoxinas nos queijos e o perfil de resistência das cepas frente a diferentes agentes antimicrobianos. Simultaneamente, foi realizado um acompanhamento do processo de produção do queijo Minas frescal e conseqüentemente a elaboração de uma cartilha de boas práticas de manipulação e fabricação de queijos, que será disponibilizada aos produtores locais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LEITE BOVINO NO BRASIL

Desde a antiguidade existem relatos de que a necessidade de sobrevivência fez com que o homem identificasse o leite e dois de seus derivados, a manteiga e o queijo, como importantes fontes nutricionais. A utilização destes produtos por civilizações antigas está comprovada em algumas citações no Antigo testamento como: Gênesis 18:8, 1º Samuel 17:18, 2º Samuel 17:29, Jó 10:10 e Provérbio 30:33. Evidentemente naquela época o leite não possuía um valor comercial, devido a sua rápida deteriorização, pois não se conhecia uma forma eficiente para a sua conservação (LEITE et al., 2006).

Há registros de que em 1531 os bovinos foram introduzidos no Brasil por Martim Afonso de Souza, na capitania de São Vicente, com o objetivo de suprir a necessidade de leite e carne. Consta que em 1535, o donatário de Pernambuco, Duarte Coelho, tenha levado gado para o nordeste, enviando algumas cabeças para a Bahia. Em 1550, Tomé de Souza, após ter fundado Salvador, na Bahia, onde instalou a capital do Brasil colonial, mandou buscar em Cabo Verde um lote de bovinos. O rebanho bovino se espalhou pelo Brasil, a partir destes pontos geográficos, dando origem às fazendas de gado que mais tarde se transformaram em povoados e vilas. Desta maneira foram fundadas no século XVIII as primeiras fazendas regulares de gado bovino no Brasil (LEITE et al., 2006).

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições higiênicas, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002b). O leite é um dos alimentos mais completos para o ser humano, pois é rico em proteínas, vitaminas, carboidratos, gorduras e sais minerais. Por esta mesma razão, é considerado um excelente meio de cultura para um grande número de microrganismos encontrados na natureza (LEITE et al., 2006).

A qualidade do leite cru está associada à carga microbiana presente. Estima-se que cerca de 48 % da produção leiteira do Brasil é realizada de forma clandestina, ou seja, à margem de qualquer tipo de fiscalização por parte das autoridades competentes (ALMEIDA FILHO e FILHO, 2000).

No Brasil, a qualidade higiênica insatisfatória do leite produzido é um problema crônico e de difícil solução. O problema pode estar relacionado com a influência das estações do ano, localização geográfica, prática de produção e manejo nas fazendas, assim como a saúde do rebanho bovino. Fatores de ordem social, econômica e cultural estão envolvidos e não têm recebido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população (LEITE et al., 2006; BORELLI, 2002).

Hoje em dia, tem-se procurado melhorar a qualidade microbiológica do leite através da manutenção de rebanho saudável e ações efetivas de boas-práticas de higiene, manuseio do leite, durante e após a ordenha, e na higienização correta dos equipamentos e utensílios utilizados. A maioria dos produtores já está se conscientizando da necessidade de promover o resfriamento do leite na faixa de zero a 4 °C, no máximo 2 hs. após a ordenha, pois desta forma é possível manter a qualidade microbiológica do leite por até 72 hs. Mesmo com todas as boas práticas, devido à sua própria natureza e composição, o leite não deixa de ser um produto altamente perecível. Portanto, não é possível garantir um leite cru totalmente isento de bactérias (LEITE et al., 2006).

A contaminação do leite inicia-se nas fazendas, durante ou após a ordenha, como resultado de deficiências da higienização do meio ambiente e dos utensílios, doenças do rebanho e do homem (SENA, 2000). Segundo Gomes e Gallo (1995), dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite, pode-se destacar o *S. aureus*, pois vários fatores propiciam condições favoráveis a sua contaminação, entre os quais a prevalência do microrganismo como agente etiológico da mastite bovina. A mastite é uma infecção que pode ser causada por *Streptococcus agalactiae*, *St. pyogenes* e *S. aureus*. Segundo Pereira et al. (1991), a mastite proveniente do *S. aureus* está associada a condições higiênico-sanitárias durante a ordenha.

Segundo dados da Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA, 2005), no ano de 2005 foram produzidos no mundo cerca de 530 bilhões de litros de leite bovino. Neste mesmo ano, o Brasil ocupou a sétima posição, sendo responsável por 4,4 % da produção mundial, ou seja, aproximadamente 24 bilhões de litros. A ingestão de leite per-capta recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 171 litros/ano. No Brasil, o Guia Alimentar do Ministério da Saúde

indica o consumo de 200 litros/ano. Em 2005 o consumo no país, esteve abaixo da recomendação, com cerca de 137 litros ingeridos por habitante (EMBRAPA, 2005).

O leite utilizado na fabricação de queijo deve ser oriundo de animais sadios, com baixa carga microbiana, não deve apresentar alterações como rancidez (excesso de acidez), desenvolvimento de sabor e aroma desagradáveis; e deve ainda ser isento da presença de resíduos de antibióticos, desinfetantes ou metais que interferem no desenvolvimento microbiano (FURTADO, 1991). Este leite deve obedecer às mesmas exigências de qualidade e de conservação requeridas para o leite pasteurizado (LISITA, 2005).

Em meados do século XIX pesquisadores já haviam observado a fermentação de alguns produtos, mas somente a partir de 1863 com os resultados dos trabalhos e observações de Louis Pasteur estabeleceu-se o processo que ficou conhecido por pasteurização. Este processo elimina as bactérias através do aquecimento na faixa de 50 a 60 °C por alguns minutos, seguido por resfriamento brusco a 5 °C. O processo de pasteurização só foi empregado no leite com a chegada da refrigeração industrial no final do século XIX, o que permitiu obter-se um leite isento de microrganismos prejudiciais a saúde e mais durável (LEITE et al., 2006).

A pasteurização tem como objetivo diminuir até níveis seguros o número de microrganismos em geral e eliminar a totalidade dos microrganismos patogênicos que possam estar presentes no leite, tornando-o inócuo ao consumo humano. Atualmente, a pasteurização é um importante recurso industrial, pois a legislação brasileira estabelece que o leite destinado ao consumo humano direto, na forma fluida, deve ser pasteurizado. Este processo pode ser realizado de duas formas: a pasteurização rápida “High Temperature Short Time” (HTST) que consiste em aquecer o leite a temperaturas entre 72 °C e 75 °C por 15 a 20 s. em equipamento com trocador de calor de placas seguida de resfriamento a 4 °C. Este processo é mais utilizado pelas indústrias de médio e grande porte. Já na pasteurização lenta, tipo batelada, “Low Temperatura Large Time” (LTLT) o leite é aquecido entre 62 °C e 65 °C por 30 a 35 min. seguido por um resfriamento brusco a 5 °C ou menos sendo utilizado em estabelecimentos de pequeno porte (BRASIL, 2002-b; LEITE et al., 2006). Nos dois tipos de pasteurização, a combinação entre tempo e temperatura é determinada em função da destruição total de bactérias patogênicas (LEITE et al., 2006).

A qualidade do leite cru e, conseqüentemente, dos leites pasteurizados e esterilizados, assim como de derivados, estão relacionados a fatores como deficiências no manejo e higiene de ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou até inexistente, mão de obra desqualificada, entre outros (BRAMLEY e MAC-KINNO, 1990).

Araújo (1984) ao analisar 100 amostras de leite cru no município de Niterói-RJ, verificou que 50 % apresentaram-se positivas para *S. aureus*, sendo que 48 % das amostras positivas apresentaram contagens variando de  $10^3$  a valores superiores a  $10^5$  UFC/mL. Santos et al. (1981), ao analisarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 46,9 % estavam contaminadas por este agente em contagens variando de  $3 \times 10^3$  a  $9,8 \times 10^5$  UFC/mL. Em Goiânia Mesquita (1988), detectou *S. aureus* coagulase positiva (SCO+) em 71,4 % das 63 amostras de leite cru examinadas.

Do ponto de vista de Corbia et al. (2000), contagens de microrganismos inferiores a  $10^6$  UFC/mL não causam alterações significativas no leite, mas o crescimento bacteriano é sempre prejudicial, seja pelas modificações que possam acarretar, pelo possível desenvolvimento de patógenos e ou pela produção e acúmulo de toxinas.

Entre as recomendações sugeridas para a produção segura de queijos a utilização de leite pasteurizado geralmente minimiza risco à saúde pública. Além desta, outras medidas são importantes para assegurar a produção de queijos livres de patógenos: o leite deve ser originado de vacas sadias, sendo coletado e mantido sob boas condições de higiene; refrigerado para minimizar a multiplicação de microrganismos; se não for utilizado imediatamente, deve sofrer pasteurização completa ou processo equivalente; e ser mantido em boas condições de higiene, desde a fabricação até a venda dos queijos aos consumidores, impedindo desta forma a contaminação (LISITA, 2005).

## 2.2 QUEIJO

### 2.2.1 Histórico

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra, e é tido como uma das formas mais antigas de se conservar o leite. A arte de sua fabricação teve início num passado remoto, milhares de anos antes do nascimento de Cristo (FURTADO, 1991). Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram, no leite e no queijo, uma fonte importante de alimentação (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, 1989). A fabricação deste produto permite aumentar a conservação do leite, já que o leite cru é um produto altamente perecível. Sendo o queijo, um produto de fácil comercialização, torna-se possível evitar a perda de tão importante e nutritiva matéria-prima (ORNELAS, 2005).

Os antigos gregos reverenciavam o queijo como alimento dos Deuses. Hipócrates em seus escritos, também faz referência aos queijos, os quais eram fabricados com leite de égua e de cabra. No reinado dos Césares a fabricação de queijos e o desenvolvimento de laticínios estenderam-se rapidamente por toda a Europa e tornou-se uma importante indústria agrícola (FURTADO, 1991).

Há registros de que a primeira fábrica de Laticínios da América do Sul foi fundada por volta de 1888, na Serra da Mantiqueira, em Minas Gerais. Após o surgimento em outros Estados de novas fábricas deste setor, sentiu-se a necessidade de divulgação do que vinha sendo feito no Brasil na área de Laticínios. Isto ocorreu em 1925, quando foi realizada a 1ª Conferência Nacional de Leite e Laticínios no Rio de Janeiro. A partir deste evento, procurou-se enfatizar a importância do leite para a saúde, o valor dos métodos científicos e técnicos aplicáveis à sua industrialização e de seus derivados, bem como os métodos mais eficientes para prevenir doenças relacionadas com a saúde pública provenientes do gado leiteiro (LEITE et al, 2006).

A fabricação de queijos no Brasil é de história relativamente recente, firmando-se como atividade industrial apenas no início do século XX, sobretudo a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses no sul de Minas Gerais e holandeses na região de Santos Dumont e Barbacena

(FURTADO, 1991). De acordo com dados da EMBRAPA (2006), o Brasil, no ano de 2006 produziu aproximadamente 495 mil toneladas de queijo.

### 2.2.2 Queijo Minas frescal

O Regulamento Técnico para Fixação e Identidade de Queijo Minas Frescal estabeleceu os requisitos mínimos de qualidade que devem ser cumpridos para a produção do queijo Minas frescal destinado ao consumo humano (BRASIL,1997). Segundo esta portaria, entende-se por queijo Minas frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5 kg.

Dentre os diversos tipos de queijos fabricados, o Minas frescal é um produto de grande popularidade, aceitação, consumo e produção em quase todo o país. Sua massa é crua, com alto teor de umidade e não maturada, que deve ser consumido em poucos dias após a sua fabricação, sendo portanto, um produto altamente perecível, mesmo sob refrigeração (PEREIRA et al., 1991; PINTO et al., 1996).

Por suas características de frescor e perecibilidade, o queijo, especialmente o tipo Minas frescal, amplamente consumido no Brasil, é um alimento potencialmente capaz de transmitir microrganismos e/ou suas toxinas ao consumidor e tem sido associado à intoxicação alimentar estafilocócica (PINTO et al., 1996; CARMO et al., 2002). Segundo a EMBRAPA (2006), no ano de 2004, o Brasil produziu 28.875 toneladas de queijo Minas frescal, tendo ocorrido um aumento na produção de 11,5 % nos últimos quatro anos.

Em algumas regiões do Sul do Brasil, esse produto é denominado de “queijo colonial” ou “queijo de colônia”, existindo várias indústrias, principalmente de pequeno porte, que produzem queijos coloniais de fabricação simples e baixo custo. Eles representam a maior parte dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias. Na maioria das vezes são comercializados em embalagem plástica comum e sem tratamento à vácuo. Geralmente, são fabricados a partir de leite cru, contrariando o artigo 200 do Regulamento do Serviço de Inspeção Federal (SIF),

onde consta que: “só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir de leite pasteurizado”. Fato este preocupante, pois o leite cru constitui uma importante via de transmissão para inúmeros microrganismos de interesse para a saúde pública, como: *Mycobacterium* sp.; *Brucella* sp.; *Streptococcus* sp.; *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp. (CÂMARA et al., 2002; ROOS et al., 2005).

No Brasil, o queijo Minas frescal é tradicionalmente produzido de forma artesanal, elaborado a partir de leite cru e com a adição de coalho. Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles produzidos desta forma, estes têm sido vendidos abertamente em nosso meio (ALMEIDA FILHO e FILHO, 2000). Com a evolução das técnicas industriais, a tecnologia de fabricação do Minas frescal sofreu modificações visando ora a melhoria da qualidade do produto, ora um aumento no rendimento. Desta evolução constante surgiram modificações diversas, entre elas a fabricação com leite pasteurizado, o uso de cloreto de cálcio e emprego de culturas lácticas (FURTADO, 1991, LISITA, 2005).

Diversos estudos ressaltam a importância da ocorrência *S. aureus* em queijo Minas frescal. Almeida Filho e Filho (2000) analisando amostras de queijo Minas frescal comercializados na cidade de Poços de Caldas, MG, evidenciaram a presença de *S. aureus* em 50 % destas amostras, com valores médios em torno de  $10^5$  UFC/g, ou seja, superior ao valor máximo permitido pela legislação brasileira vigente, RDC nº. 12 de janeiro de 2001, que limita a concentração de microrganismos em até  $5 \times 10^2$  UFC/g. Tais contagens apresentaram-se bem próximas das que são necessárias para a produção de enterotoxinas em geral. Rodrigues et al. (1995) em Viçosa-MG, Cerqueira et al. (1994) em Pará de Minas-MG e Sabioni et al. (1988) em Ouro Preto - MG observaram que 100, 60 e 21,5 %, de suas amostras de queijo, respectivamente, apresentavam contagens de *S. aureus* acima do referido padrão legal.

Loguercio e Aleixo (2001) avaliaram a qualidade microbiológica de 30 amostras de queijo Minas frescal artesanal comercializado na região metropolitana de Cuiabá-MT. Das amostras analisadas 93,3 % apresentaram contagens acima do padrão para coliformes fecais, 96,7 % das amostras apresentaram contagem superior ao padrão aceitável para *S. aureus* e 43,3 % delas, foram consideradas como “Produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos”, pois a contagem foi superior a dez vezes o limite estabelecido nos padrões específicos.

Carmo et al. (2002) analisaram amostras de queijo Minas frescal e leite cru, suspeitos de serem a origem de dois surtos de doenças alimentares que acometeram 378 pessoas nas cidades de Passa-Quadro e Manhuaçu, MG. As análises dos queijos mostraram que o *S. aureus* estava presente em concentrações que variavam de  $1 \times 10^5$  a  $2 \times 10^8$  UFC/g, sendo detectada a produção das enterotoxinas do tipo A, B e C. No leite cru a contagem foi de  $2,4 \times 10^3$  UFC/g e foi evidenciada a presença das enterotoxinas do tipo C e D.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS), através da Resolução RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece os seguintes padrões microbiológicos aceitáveis para o queijo Minas frescal: contagens inferiores a  $5 \times 10^2$  coliformes/g a 45°C e  $10^3$  para estafilococos coagulase positiva (SCO+)/g, ausência de *Salmonella* sp. e ausência de *L. monocytogens* em 25g do produto.

No entanto, o queijo Minas frescal por apresentar elevado teor de umidade e passar por uma grande manipulação, apresenta condições propícias para a contaminação de microrganismos patogênicos ou produtores de metabólitos que podem causar intoxicação e/ou infecções alimentares nos seres humanos (CÂMARA et al., 2002). Tendo em vista as diferentes vias que podem levar a contaminação de queijo Minas frescal e seu alto consumo, é de suma importância a análise microbiológica desse alimento como forma de avaliar os riscos que podem representar para a saúde do consumidor.

### 2.3 MANIPULADOR

Segundo a OMS (1989), o termo “manipulador de alimentos”, é definido em um sentido amplo, correspondente a qualquer indivíduo que entre em contato com um produto alimentício ou parte dele, nas etapas de produção, processamento, embalagem, armazenamento, transporte, distribuição e venda de alimentos.

De acordo com Silva Jr. (2005), a OMS relata que mais de 60 % dos casos de DTA's são provocadas por microrganismos, tendo sua origem na manipulação incorreta dos alimentos, sendo o manipulador o principal veículo de transmissão. É muito freqüente a falta de cuidado dos manipuladores, como a não obediência as

boas práticas e a lavagem incorreta das mãos, propiciando a contaminação dos alimentos (XAVIER et al., 2007).

A maior parte dos manipuladores são portadores sintomáticos e/ou assintomáticos de vários patógenos e não possuem uma real consciência do perigo que uma contaminação biológica representa para a saúde pública (GÓES, 2001).

A literatura tem demonstrado que o perfil higiênico-sanitário dos manipuladores de alimentos tem se mostrado freqüentemente inaceitável, no que diz respeito à contaminação microbiana encontrada em diversos sítios anatômicos. Portanto, estes contaminam alimentos via contato manual ou via trato respiratório através de tosse e espirro. A contaminação geralmente ocorre após o tratamento térmico do alimento (GÓES, 2001; OLIVEIRA et al., 2003).

Os principais reservatórios de *S. aureus* são os homens e os animais, principalmente os bovinos. Esta bactéria habita com freqüência a nasofaringe do ser humano, sendo que 15 % dos adultos saudáveis a possuem. Desta maneira podem facilmente contaminar as mãos e pele, podendo vir a contaminar os alimentos e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com o portador (OLIVEIRA et al., 2003; XAVIER et al., 2007). Os *Staphylococcus* são os responsáveis pela maior parte das mastites clínicas e subclínicas em bovinos e desta forma podem contaminar o leite e seus derivados (SENA, 2000).

O queijo Minas frescal é um produto fabricado geralmente por manipuladores não treinados. Desta forma pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001), haja vista que é amplamente reconhecida a presença de bactérias nos queijos produzidos a partir de leite *in natura*, sendo muitas vezes atribuídas a falhas no processamento de pasteurização ou mesmo uma recontaminação do leite após o tratamento térmico correto. A introdução das mãos de manipuladores para verificar o ponto de corte, durante a enformagem e a viragem é um fator preponderante para a elevada contaminação do queijo Minas Frescal (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001; ALMEIDA FILHO e FILHO, 2000).

Acco et al. (2003), apontam que quando se pretende identificar *S. aureus* em estudos epidemiológicos de toxinfecções e em investigação de fontes de contaminação de alimentos, a presença e tipificação de mais de uma cepa de *S.*

*aureus* em manipuladores deve ser determinada. A existência de indivíduos envolvidos em surtos de DTA's portadores de múltiplas cepas de *S. aureus* simultaneamente não é rara, se considerarmos que 20 a 40 % de pessoas adultas são colonizadas por esta bactéria em alguma época da vida (JONES et al., 2002; ACCO et al., 2003; LE LOIR et al., 2003).

Investigando a diversidade genética de *S. aureus* isolados de diversas fontes, em fazendas de leite de cabra do sudeste da França, pela macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel em campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE), Vautor et al. (2003), observaram que as bactérias isoladas das mãos dos trabalhadores apresentaram o mesmo perfil eletroforético daquelas isoladas do queijo, demonstrando o papel do manipulador na disseminação de *S. aureus* nas fazendas. Observaram ainda, que 80 % dos fazendeiros eram portadores deste microrganismo nas fossas nasais.

Xavier et al., (2007) descrevem que Fernandes et al., em 1998, ao investigar um surto de intoxicação alimentar no município de Contagem, MG, verificaram que a contaminação dos alimentos por *S.aureus* teve origem nos manipuladores, pois o material coletado da orofaringe e dos leitos subungueais de treze cozinheiros, mostrou que 84,6 % das amostras apresentaram enterotoxinas do tipo A, B, C e D.

Em Belo Horizonte, MG, Pinto et al., (2001) observaram que 46,7 % das amostras colhidas das mãos de funcionários de uma fábrica de pão de queijo, apresentavam *S. aureus*. No Rio de Janeiro, trabalhadores de uma indústria de embutidos apresentavam *Staphylococcus* enterotoxigênicos nas mãos (11 %), narinas (11 %) e orofaringe (45 %) (MACIEL et al., 2002). Estes resultados permitem inferir que os alimentos muito manipulados são mais facilmente contaminados e sendo assim, capazes de produzir intoxicação alimentar por *S. aureus* e os manipuladores são importantes fontes de contaminação deste microrganismo. A implementação de cursos de educação básica em saúde e higiene dos alimentos, as boas práticas de fabricação e controle para os manipuladores, tanto em domicílios quanto em estabelecimentos coletivos são instrumentos significativos para prevenção da contaminação dos alimentos (XAVIER et al., 2007).

## 2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A OMS ressalta que as doenças de origem alimentar são consideradas o maior problema de saúde pública (LE LOIR et al., 2003). Segundo a RDC N<sup>o</sup>.12 de 02 de janeiro de 2001, DTA é definida como: doença causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou de toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico. Os sinais e sintomas variam muito, dependendo dos agentes etiológicos, mas diarreia e vômitos são os sinais mais comuns.

Na cadeia de transmissão das DTA's, os alimentos são considerados veículos dos agentes infecciosos e tóxicos. Eles podem ser contaminados durante todas as etapas por produtos químicos, toxinas naturais de plantas e de animais, vírus, parasitas, bactérias patogênicas, fungos toxigênicos, através da manipulação e conservação inadequadas dos alimentos. Entre os microrganismos de interesse em alimentos, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes aqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Existem mais de 250 diferentes tipos de DTA's e estas podem ser divididas em duas grandes categorias: as infecções e as intoxicações alimentares. As infecções alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes microrganismos aderem à mucosa do intestino humano e proliferam, colonizando-o. Em seguida, pode ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos, ou ainda, a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal. Entre estas bactérias invasivas, destacam-se: *E. coli* invasiva, *Salmonella* e *Shigella*. Entre as toxigênicas, incluem-se *E. coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* e *S. aureus*. As intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas. Estas toxinas são produzidas durante proliferação do(s) microrganismo(s) toxigênico(s) no alimento. Dentro deste merecem destaque o *Clostridium botulinum*, *S. aureus*, *B. cereus* forma emética e os fungos produtores de micotoxinas (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

É difícil estimar a incidência global das DTA's, mas segundo os dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, de 1999 a 2004 foram registrados a ocorrência de 3.410.048 internações, com uma média de 568.341 casos por ano. As regiões norte e nordeste do país foram as que

apresentaram as maiores taxas de incidência, comparadas com as outras regiões. De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), de 1999 a 2002, ocorreram 25.281 óbitos por DTA, com uma média de 6.320 óbitos/ano. No Brasil, os custos com os casos internados por DTA de 1999 a 2004, informados pelo SIH, chegam a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano. O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) (2002) estima que 76 milhões de pessoas sofram de DTA a cada ano nos EUA, o que provoca 325.000 hospitalizações e mais de 5.000 mortes nesse país. Estima-se que o custo anual das DTA's nos EUA seja de 5 a 6 bilhões de dólares em gastos diretos e perda de produtividade. No Brasil os custos com casos internados por DTA de 1999 a 2004 chegaram a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As DTA's podem dar origem a surtos. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), surto de DTA é o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimentos, inclusive água, da mesma origem e onde a evidência epidemiológica ou análise laboratorial apontam os alimentos e/ou água como veículos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Com as notificações de surtos de DTA's ocorridas durante o período de 1999 a 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.737 surtos, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Houve uma média de 684 surtos por ano, com uma mediana de sete doentes por surto, sendo 51 % dos casos do sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Entre as 27 unidades federadas, aquelas que mais contribuíram com notificação de surtos, desde a sua implantação, foram: São Paulo, com 1.099 surtos (29,4 %); Rio Grande do Sul, com 1.053 surtos (28,1 %); Paraná, com 628 surtos (16,8 %). No Tocantins foram registrados apenas 3 surtos representando 0,08 % dos surtos notificados ao Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Dos 3.737 surtos de DTA's, 2.494 haviam informações sobre o tipo de alimentos, sendo que, os que mais predominavam eram ovos/maionese, representando 21,1 %, seguido por alimentos com preparação mista (18,9 %), carne vermelha (13 %) e leite e derivados representando (6,4 %) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Entre os surtos investigados neste período 40 % (1.520/3.737) não continham informações sobre o agente etiológico. Dos 581 surtos encerrados com dados sobre o agente etiológico confirmados pelo critério laboratorial clínico e/ou bromatológico, 34,7 % (202/581) foram causados por *Salmonella* sp. seguida por *S. aureus*, com 11,7 % dos casos, sendo que as residências foram os locais onde ocorreram o maior número de surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O envolvimento de microrganismos em surtos de toxinfecção alimentar é uma realidade que pode ser constatada por vários relatos, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O *S. aureus* é um importante patógeno envolvido em surtos de intoxicação alimentar (enterotoxicose) resultante da ingestão de uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas em alimentos previamente contaminados (DINGES et al., 2000). As peculiaridades do habitat deste microrganismo tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BERGDOLL, 1989; CARMO et al., 1990; SENA, 2000; STAMFORD et al., 2006).

Segundo Bergdoll (1989), o tipo mais comum de intoxicação alimentar resulta do crescimento de *S. aureus* produtores de enterotoxinas tipo A e B. A enterotoxina estafilocócica tipo A está associada a 70 % dos casos confirmados de intoxicação alimentar (BETLEY et al., 1984; XAVIER et al., 2007). O queijo é um dos produtos mais envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica no mundo. Isto pode ser explicado pelo fato deste ser um produto muito manipulado, além de outros agravantes como condições higiênico-sanitárias inadequadas em toda cadeia produtiva, principalmente em queijos elaborados de forma artesanal e sem inspeção (BERGDOLL, 1989; SALOTTI et al., 2006).

Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica são: náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaléia. A intoxicação geralmente não é letal, sendo que os sintomas duram em média de 1 a 2 dias, podendo evoluir para quadros mais severos, dependendo da susceptibilidade do indivíduo (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). O período de incubação é curto, variando de 30 min. a 6 hs. após a ingestão do alimento contaminado, com média de 4 hs.. Mortes por intoxicação alimentar estafilocócica não são comuns (JABLONSKI e BOHACH 1997; LE LOIR et al., 2003). Apesar disto, esta intoxicação é considerada uma doença de alto custo social em termos de despesas com hospitalização, faltas ao trabalho e conseqüente

diminuição de produtividade e prejuízo com o descarte de alimentos contaminados (GONÇALVES, 1998).

De acordo com Cunha Neto et al. (2002), o período de incubação e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Níveis dessas toxinas variando de 0,001 a 0,4 µg/g do alimento, são suficientes para provocar a intoxicação em indivíduos mais sensíveis.

A primeira notificação de intoxicação envolvendo o *Staphylococcus* foi associada à ingestão de uma torta de carne. Em 1885, Stenberg descreveu um surto decorrente da ingestão de queijo contendo *Staphylococcus* em Michigan, nos Estados Unidos (apud BAIRD-PARKER, 1990). Certamente vários casos de intoxicação estafilocócica ocorreram no passado, porém naquela época não haviam métodos eficazes de identificação de microrganismos disponíveis. Em 1914, Barber, investigando um surto envolvendo leite proveniente de uma fazenda nas Filipinas, demonstrou claramente que os estafilococos eram capazes de causar intoxicações e atribuiu este fato a uma toxina produzida pela bactéria, sem, entretanto, demonstrar a presença da referida toxina em filtrados da cultura. Foi somente em 1930, que Dack e seus colaboradores da Universidade de Chicago (EUA) demonstraram que o surto foi realmente causado por uma toxina filtrável produzida por *Staphylococcus*, posteriormente esta toxina foi denominada de enterotoxina (BERGDOLL, 1990; BAIRD-PARKER, 1990). Entre as espécies de *Staphylococcus*, o *S. aureus* é o agente mais comumente envolvido em surtos de intoxicação alimentar. Porém, espécies como *S. intermedius* já foram descritas como agente de surto de intoxicação alimentar (KHAMBATY et al., 1994; BORELLI, 2002).

No Brasil, Carmo e Bergdoll (1990), ao analisarem 18 surtos de intoxicação estafilocócica pela ingestão de bolo recheado e queijo Minas em Belo Horizonte - MG detectaram simultaneamente enterotoxinas do tipo A e B em 12 dos surtos. A enterotoxina do tipo A foi detectada isoladamente em apenas um caso e a B em outro. Sabioni et al. (1988), observaram a ocorrência de intoxicação alimentar em Ouro Preto - MG, proveniente da ingestão de queijo Minas contaminado por *S. aureus*. Devido a elevada contaminação da amostra as linhagens foram submetidas à avaliação da presença de enterotoxinas, as quais em 80 % foram detectadas a produção da enterotoxina do tipo A, 20 % das cepas produziram SEB, 30% a SED, e 10% a SEE. Neste caso, os autores observaram que algumas linhagens foram produtoras de duas ou mais enterotoxinas. Carmo et al. (2003), em um surto de

intoxicação estafilocócica envolvendo 42 pessoas no município de Passos – MG, detectaram uma contagem superior a  $10^8$ UFC/g, de *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas do tipo A, B e D. Neste caso, também foram isoladas culturas a partir da região orofaríngea, leito subungueal e mucosa nasal dos manipuladores de alimentos revelando desta forma que eram portadores assintomáticos de cepas *S. aureus* produtores de enterotoxinas do tipo A, B, C e D. Em apenas um manipulador foi isolada em sua mucosa nasal uma cepa de *S. aureus* produtora de TSST-1.

Em todos os casos de intoxicação alimentar estafilocócica, o alimento ou um de seus ingredientes foi contaminado por uma cepa de *Staphylococcus* sp. produtora de enterotoxina e foi exposto, pelo menos por um período, a temperaturas que permitiram a multiplicação desta bactéria. Isto pode ocorrer principalmente por falhas no processo de refrigeração ou quando a temperatura de multiplicação da bactéria é exigida durante o processamento do alimento, por exemplo, na fabricação do queijo. Os alimentos mais freqüentemente envolvidos na intoxicação alimentar estafilocócica diferem de um país para outro. Isto pode ser explicado pelas diferenças no consumo e hábitos alimentares de cada país. No Reino Unido, no período de 1969 a 1990, 53 % das intoxicações provocadas por *Staphylococcus* ocorreram em produtos a base de carne, em especial presuntos, 22 % em produtos a base de aves e 8 % em derivados do leite. Na França, entre 1999 e 2000 o leite e seus derivados em especial o queijo foram responsáveis por 32 % dos casos de intoxicação estafilocócicas. Isto se deve ao grande consumo de queijo fabricado a partir de leite cru (DE BUYSER et al., 2001; LE LOIR et al., 2003).

O *S. aureus* enterotoxigênico normalmente causa intoxicação alimentar quando é encontrado nos alimentos em concentrações iguais ou superiores a  $5 \times 10^5$  células/g (SENA, 2000). Santos e Genigeorgis (1981) estudaram a capacidade de *S. aureus* sobreviver, crescer e produzir enterotoxina em queijo Minas. Eles observaram que 57 % dos queijos fabricados com leite pasteurizado apresentavam populações superiores a  $10^6$  UFC/g de *S. aureus* sendo também detectadas as enterotoxinas do tipo A, B e C em 62 % das amostras contaminadas por esta bactéria.

Os alimentos mais comuns envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica são o leite, cremes, tortas recheadas com creme, entre outros (CARMO, 1998).

## 2.5 *Staphylococcus* sp.

Em 1880, um cirurgião escocês, Sir Alexander Ongston publicou seus dados que mostravam conclusivamente que os cocos em forma de cachos eram as causas de uma série de doenças piogênicas no homem. Posteriormente, ele nomeou o organismo de “staphylococcus”, um nome derivado do grego “staphyle”, que significa cachos de uvas, e “coccus”, que significa grãos ou sementes (BAIRD-PARKER, 1990). Em uma série de experimentos clássicos ele demonstrou que quando injetava secreções contendo estafilococos em ratos eles desenvolviam os mesmos sintomas observados nos pacientes com feridas de onde a secreção foi retirada. Além disso, ele demonstrou que quando esta secreção era aquecida ou tratada com fenol, os sintomas não ocorriam (BAIRD-PARKER, 1990).

Em 1884, Rosenbach obteve uma cultura pura de *Staphylococcus* e ao estudar suas características em laboratório, considerou que o organismo isolado era idêntico ao descrito por Ongston, e por essa razão adotou o nome *Staphylococcus* para o gênero (BAIRD-PARKER, 1990). Desde então esta bactéria passou a ser mais pesquisada, devido a sua importância na indústria de alimentos e medicina, sendo um dos patógenos mais envolvidos em surtos de origem alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Desde o trabalho original de Rosenbach o escopo e o conteúdo do gênero *Staphylococcus* têm sofrido modificações. Em 1920 Winslow et al. classificaram os *Staphylococcus* na família Micrococcaceae. De 1908 até as cinco primeiras edições do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, apenas duas espécies de estafilococos foram reconhecidas, *S. aureus* e *S. epidermidis* (apud BAIRD-PARKER, 1990). Na sexta edição do Manual Bergey’s as duas espécies foram transferidas para o gênero *Micrococcus* por Hucker, que concluiu que os estafilococos e os micrococos não eram distintos, e que os *Micrococcus*, tinham prioridade sobre os *Staphylococcus*. Foi somente na sétima edição que o gênero *Staphylococcus* foi listado por Evans, que conseguiu demonstrar que os estafilococos eram fisiologicamente distintos dos micrococos em sua habilidade de crescer anaerobiamente e fermentar a glicose, mas somente na oitava edição que Baird-Parker reconheceu três espécies (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*) (BAIRD-PARKER, 1990; CORBIA et al., 2000).

Atualmente o gênero *Staphylococcus*, pertence à família Micrococcacea, abrange 42 espécies registradas no banco de dados “Taxonomy Browser” (NCBI, 2007), sendo 20 delas associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. A espécie mais ubíqua é o *S. epidermidis*, encontrado na pele humana e que raramente produz doença. O *S. aureus*, por sua vez é o mais patogênico do gênero, por produzir um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas superficiais até severas infecções sistêmicas, no homem e em outros animais. É composto por microrganismos imóveis, Gram-positivos, produtores de catalase, mesófilos, não esporulados, agrupados em massas irregulares ou sob a forma de cachos de uva, medindo cerca de 0,5 a 1 µm de diâmetro. As bactérias desse gênero diferem das espécies do gênero *Micrococcus* por serem oxidase-negativa, suportar altas concentrações salinas (10-15 %), fermentarem glicose em anaerobiose e por possuírem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular (LANCETTE e BENNETT, 2001; MURRAY et al., 2004; KONEMAN, 2001).

Os estafilococos crescem rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos em condições aeróbias ou anaeróbias. A temperatura ótima de crescimento está em torno dos 37° C, mas formam melhor o seu pigmento em temperatura ambiente (20 a 25 °C), fermentam lentamente muitos carboidratos, produzindo ácido láctico, mas não produzem gás (CORBIA et al., 2000; LE LOIR et al., 2003).

Os estafilococos estão amplamente distribuídos na natureza e apesar de serem encontrados predominantemente na pele, glândulas da pele e mucosas de mamíferos e aves, também podem ser encontrados em outros sítios como boca, sangue, glândulas mamárias e trato intestinal, genito-urinário e respiratório (MURRAY et al., 2004).

### 2.5.1 *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* é a que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, de origem alimentar ou não. As cepas de *S. aureus* são sensíveis a uma série de bacteriófagos, o que auxilia o estudo de surtos de intoxicação, levando muitas vezes à fonte da infecção (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

O *S. aureus* está presente nas narinas, na pele e pêlos de animais de sangue quente, sendo que 30 a 50 % da população humana é portador desta bactéria (LE LOIR et al., 2003). A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem, e a partir deste foco estas bactérias, atingem tanto a epiderme e feridas como o ar, água, solo, e qualquer superfície ou objeto que entre em contato com o portador (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

Além do homem, a maioria dos animais domésticos também são portadores ou apresentam-se contaminados por esta bactéria. Um exemplo típico é a mastite estafilocócica do gado leiteiro. Caso o leite infectado por esta bactéria seja consumido ou utilizado no preparo de queijos, haverá grandes chances de ocorrer intoxicação (ARAUJO, 1984).

Os *S. aureus* são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 °C a 48 °C; e suas enterotoxinas são produzidas entre 10 °C e 46 °C, com temperatura ótima entre 40 °C e 45 °C. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permanecem neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo. Em geral quanto menor a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxinas (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10 a 20 % de Cloreto de sódio (NaCl) e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Em relação ao pH, *S. aureus* é capaz de crescer na faixa de 4,0 a 9,8 com o ponto ótimo entre 6 e 7. Considerando a atividade de água (Aa), os estafilococos são únicos em sua capacidade de crescer em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não- halófilas. O valor mínimo da Aa para crescimento de *S. aureus* é de 0,83 Aa (FRANCO, 2004).

O *S. aureus* pode ser diferenciado das outras espécies do gênero pela produção de coagulase, termonuclease, acetoína,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase e  $\alpha$ -toxina (hemólise), produção de ácidos a partir do manitol, maltose, xilose, sacarose e da trealose, sensibilidade a novobiocina, sensibilidade a lisostafina, presença de ribitol no ácido teicóico e proteína A e fator de aglutinação na parede celular (LANCETTE e BENNETT, 2001). A lisostafina é uma endopeptidase que rompe as ligações cruzadas dos pentapeptídeos ricos em glicina do glicopeptídeo da parede celular dos estafilococos. Esta atividade torna as células sensíveis à lise osmótica (KONEMAN et al, 2001).

Segundo Lancette e Bennett (2001), a característica mais confiável para a identificação de *S. aureus* é determinada pela prova da coagulase, que pode ser realizada mediante procedimento em lâmina ou em tubo. A coagulase é uma enzima que coagula o plasma humano e o de coelho.

Uma característica única dos *S. aureus* é a presença do fator de aglutinação nas células. Esta prova pode ser utilizada para diferenciar o *S. aureus* coagulase-positiva de outras espécies também coagulase positiva como, por exemplo, o *S. hyicus*, pois o fator de a aglutinação presente nas células do *S. aureus* liga-se ao fibrinogênio ou a fibrina presente no plasma humano ou de coelho, resultando na aglutinação das células. Esta aglutinação é rápida (em torno de 2 min.) e os resultados são mais nítidos que o teste de coagulase em tubo (KONEMAN et al., 2001; LANCETTE e BENNETT, 2001).

Outra prova frequentemente utilizada para a identificação rotineira de *S. aureus* é a termonuclease, um teste simples e rápido. Este detecta a produção de nucleases termoestáveis. Nucleases em geral têm a função de hidrolisar o DNA para produzir oligonucleotídeos e nucleotídeos (SÁ et al., 2004). Em 1972, Lachica et al. constataram que os *S. aureus* são capazes de produzir nucleases termorresistentes, uma propriedade, até então, não identificada em outros microrganismos. Madison e Baselski em 1983 sugeriram que a produção desta enzima é uma importante característica para a identificação do *S. aureus*. Alguns estudos sugerem o uso simultâneo dos testes da coagulase e termonuclease, para uma caracterização mais precisa desses isolados (KLOSS, 1990). O uso somente dos testes de coagulase e termonuclease podem resultar em resultados falsos-positivos visto que duas outras espécies, *S. intermedius* e *S. hyicus*, são ambos coagulase e termonuclease positivos. Portanto, surge a necessidade da realização de outros testes bioquímicos durante a identificação de *S. aureus*, como a fermentação aeróbia e anaeróbia de açúcares, produção de acetoína, produção de  $\beta$ -galactosidase, crescimento em meios seletivos como Àgar sal manitol e Àgar Baird- Parker (BP), dentre outros (ARAÚJO, 1984; KLOSS, 1990; LANCETTE e BENNETT, 2001; CARMO et al., 2002).

Os meios de cultura empregam várias substâncias químicas que são inibidoras para o crescimento de espécies competitivas com *S. aureus*. As duas substâncias seletivas tóxicas mais frequentemente utilizadas em meios de isolamento de estafilococos são o NaCl e o Telurito de potássio ( $K_2TeO_3$ ). Várias

concentrações desses agentes têm sido utilizadas, variando de 5,5 a 10 % de NaCl e de 0,0025 a 0,05 % de  $K_2TeO_3$ . Outras substâncias químicas como o sulfato de amônia, o ácido ascórbico, glicina, cloreto de lítio e a polimixina são frequentemente combinados com o cloreto de sódio e o Telurito de potássio (LANCETTE e BENNETT, 2001).

As principais características do *S. aureus* que devem ser observadas para elaboração de um meio seletivo são:

- A capacidade de crescer na presença de 7,5 a 10 % de NaCl;
- A capacidade de crescer na presença de 0,01 a 0,05 % de  $K_2TeO_3$  em combinação com 0,2 ou 0,5 % de cloreto de lítio, e de 0,12 a 1,26 % de glicina, ou 40µg/mL de polimixina;
- A habilidade de reduzir o  $K_2TeO_3$ , produzindo colônias negras, aerobicamente;
- A forma, a aparência e o tamanho das colônias;
- A pigmentação das colônias;
- A atividade de coagulase e a produção de ácidos em meios sólidos;
- A habilidade de hidrolisar a lecitina de gema de ovo;
- A produção de fosfatase;
- A produção de termonuclease;
- Crescimento a 43 °C em meios seletivos (LANCETTE e BENNETT, 2001).

No caso de amostra de alimentos, existem meios comuns e seletivos-indicadores que podem ser empregados no isolamento de *S. aureus*, entre os quais inclui-se o Ágar sal manitol e o Ágar BP (Baird Parker). No ágar BP as colônias típicas são circulares, de coloração negra, com brilho, puntiformes e circundadas por um halo de lipase e outro transparente mais externo de lecitina. Já no ágar sal manitol as colônias têm aspecto amarelo com presença de um halo também de cor amarela ao seu redor, esta coloração se dá devido a fermentação do manitol que resulta na produção de ácido que altera o pH ao redor da colônia. (FRANCO, 2004).

Nascimento et al. (2001) observaram as limitações da técnica de isolamento e enumeração de *S. aureus*. Eles verificaram que além das variantes de SCO+, também existem limitações na identificação visual das colônias em meios de isolamento, evidenciadas no decorrer do isolamento e da enumeração de SCO+, em queijos Minas frescal, e alertaram para a necessidade de aplicação de testes bioquímicos subseqüentes, para viabilizar os critérios de diagnóstico. Nascimento et

al. (2001) analisando 59 amostras de queijo Minas frescal isolaram 18 colônias de *S. aureus*, 25 colônias de SCO+, 93 colônias de *Micrococcus* sp., 64 de *Streptococcus* sp. e 4 colônias de leveduras. Na maioria das placas com o ágar BP o crescimento de colônias típicas (pretas, puntiformes, brilhantes), apresentam diferenças em relação á presença/ausência de halo, variação de tamanho do próprio halo e diferenças de tamanho de colônias. Estas diferenças foram confirmadas por testes bioquímicos complementares que evidenciaram a presença de bactérias diferentes. Em alguns casos ficou constatado que colônias com a presença ou ausência de halo após o isolamento e identificação bioquímica, foram consideradas *S. aureus*. Desta maneira foi constatado que o critério de diagnóstico, usado pela visualização da presença de halo ao redor das colônias negras é passível de falhas, e por isso, não deve ser considerado o único indicador de *S. aureus*. Outra observação realizada foi em relação a tonalidade das colônias, pretas nos meios tradicionais de isolamento de amostras de alimentos traduzidas pela habilidade da bactéria de reduzir o telurito de potássio presente no ágar BP. A presença de colônias negras não ficou restrito às bactérias isoladas dos queijos analisados, visto que, verificou-se também a presença de algumas leveduras, com características de *S.aureus*.

As técnicas de biologia molecular, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Multiplex PCR, também são utilizadas para detectar *S. aureus*. Pinto et al. (2005) descreveram que em 1992 Brakstad et al., desenvolveram um protocolo de PCR para amplificar a seqüência do gene *nuc*, que codifica uma endonuclease termoestável produzida pelo *S.aureus*. Em 1997 Wang et al., desenvolveram um protocolo universal de PCR para detecção de 13 espécies de patógenos alimentares, dentre eles, o *S. aureus*.

Nos últimos anos, o método seguro para identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* consiste na utilização de sistemas comerciais de teste em miniatura, baseados em imunoenaios e testes bioquímicos, que garantem uma maior precisão na identificação de SCO+. Entretanto, devido ao alto custo destes kits e cartelas comerciais, muitos laboratórios tendem a adotar provas clássicas no trabalho rotineiro de caracterização fenotípica dos isolados (NASCIMETO et al., 2001).

## 2.6 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As enterotoxinas estafilocócicas, são um grupo de proteínas simples (em média 250 aminoácidos, peso molecular de 26.000 a 29.600 Daltons) que são produzidas durante todas as fases do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a metade e o fim da fase exponencial. São solúveis em água e em soluções salinas. São ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, e resíduos de tirosina. A maioria delas possui um “loop” de cistina necessário à apropriada conformação da molécula e que provavelmente está envolvido na atividade emética. São altamente estáveis, resistindo à inativação pelas proteases gastrintestinais como pepsina e tripsina, assim como ao calor. Também resistem à quimotripsina, renina e papaína (TSEN et al., 1998; LE LOIR et al., 2003). De acordo com Balaban e Rasooly (2000), a estabilidade ao calor parece ser dependente do meio onde a toxina se encontra, do pH, concentração de sal e outros fatores ambientais. Além disso, a inativação térmica é espontaneamente reversível em pH alcalino ou tratamento com uréia. Os dados apontam que as enterotoxinas resistem a condições que facilmente destroem as bactérias que as produzem e podem estar presentes em alimentos, mesmo na ausência da bactéria.

Algumas cepas de *S. aureus* produzem exoproteínas adicionais e estas pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas juntamente com a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), e as toxinas epidermolíticas ET-A e ET-B que causam a Síndrome Estafilocócica da pele escaldada. Já a TSST-1 causa a síndrome do choque tóxico (BALABAN e RASOOLY, 2000; BORELLI, 2002; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Com base em métodos sorológicos, as enterotoxinas são classificadas como: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ, sendo que a SEC é subdividida pelas pequenas variações antigênicas em SEC1, SEC2, SEC3 (CARMO et al., 2002). Genotipicamente foram identificados mais nove tipos de enterotoxinas: SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU (BALABAN e RASOOLY, 2000; BORELLI, 2002). A toxina da Síndrome do Choque tóxico foi equivocadamente denominada de SEF e por isto não existe a enterotoxina sorotipo F (BERGDOLL e CHESNEY, 1991; TSEN et al., 1998).

As enterotoxinas estafilocócicas apresentam também a propriedade de termorresistência, o que constitui um ponto crucial no controle de qualidade de

alimentos, porque a maioria dos alimentos processados sofre algum tratamento térmico durante o processamento. Por exemplo, a pasteurização do leite destruirá o microrganismo (*S. aureus*), mas não inativará a toxina, caso já esteja presente (FRANCO e LANDGRAF, 2004). Segundo Bergdoll e Chesney (1991), as enterotoxinas estafilocócicas podem ser inativadas por tratamento térmico utilizado na esterilização de alimentos enlatados quando estão em baixas concentrações. Schwabe et al. (1990), mostraram que a inativação térmica de SEA, SEB e SEC varia de acordo com a matriz alimentar e o pH. Portanto é muito difícil calcular o impacto de tratamento térmico na atividade das enterotoxinas, visto que isto depende do tipo e da concentração de enterotoxina e da matriz alimentar (LE LOIR et al., 2003).

Franco e Landgraf (2004), descreveram que as enterotoxinas apresentam várias ações, entre elas:

- Ação emética: é a reação mais freqüente observada em intoxicação. Os sítios desta ação parecem localizar-se no intestino. Este estímulo é transferido através do nervo vago ao centro do vômito, que faz parte do sistema nervoso central (SNC). O centro do vômito induz, de alguma maneira, a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado provocando o vômito. Por esta razão, as toxinas estafilocócicas deveriam ser denominadas neurotoxinas e não enterotoxinas.
- Ação diarréica: a diarréia é o segundo sintoma mais comum na intoxicação alimentar estafilocócica. Este mecanismo de ação ainda não está perfeitamente esclarecido, porque aparentemente é diferente de outras diarréias, como por exemplo, as provocadas por *Clostridium perfringens* e por *Bacillus cereus*. Nestes dois casos, as toxinas provocam uma dilatação na alça de intestino, enquanto que as estafilocócicas não o fazem. Uma das prováveis explicações é a ativação de um mecanismo secretor de Na e K. Além disso, caso uma quantidade suficiente de enterotoxina esteja presente no alimento, ela causará inflamação e irritação da mucosa do estômago e intestino delgado.
- Atividade de superantígenos: as enterotoxinas estafilocócicas pertencem a uma grande família das toxinas estafilocócicas e estreptocócicas pirogênicas, que compartilham relações filogenéticas, estrutura, função e seqüência homóloga. Estas toxinas pirogênicas causam síndromes, como

a Síndrome do Choque Tóxico e estão envolvidas nas intoxicações alimentares (BALABAN e RASOOLY, 2000). Elas apresentam atividades biológicas comuns, como imunossupressão e o estímulo a proliferação de células T não específicas.

A atividade de superantígeno resulta da interação direta das enterotoxinas com as células T receptoras de antígenos (TCR) e com o Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) classe II, das células apresentadoras de antígenos (APC). Esta interação leva a ativação e proliferação das células T não-específicas e na secreção de interleucinas que podem estar envolvidas nos mecanismos de toxicidade das enterotoxinas (LE LOIR et al., 2003).

As enterotoxinas apresentam como sítio de ação o sistema gastrointestinal. A quantidade requerida para desencadear a doença em indivíduos sensíveis é variável, podendo ser de 100 ng a 1 µg (Bergdoll, 1990). De acordo com Fagundes e Oliveira (2004) a quantidade mínima de enterotoxinas estafilocócica necessária para causar sintomatologia em humanos é de 200 ng. Este valor foi estimado a partir de um surto de gastroenterite atribuído a leite achocolatado, cujas amostras revelaram enterotoxina do tipo A no nível médio de 144 ng/embalagem.

A capacidade de produzir uma ou mais enterotoxinas é encontrada em 30 a 50 % das cepas de *S. aureus* (CARDOSO et al., 2000). A produção simultânea de diferentes tipos de toxinas pode aumentar os seus efeitos toxigênicos isolados, sugerindo que essa co-produção possa desempenhar papel importante na patogenia das infecções intramamárias produzidas por este microrganismo. Fagundes e Oliveira (2004) demonstraram que existe uma associação entre a atividade enzimática específica, a enterotoxigenicidade e a resistência de *S. aureus* a vários antibióticos, principalmente em amostras produtoras de mais de um tipo de enterotoxina.

A enterotoxina do tipo A está relacionada com maior frequência nos casos de toxinfecções alimentares e pode ser veiculada por alimentos de origem animal, especialmente leite e derivados, representando um grande problema de saúde pública (SENA, 2000; SÁ et al., 2004; PINTO et al., 2005).

Algumas bactérias do gênero *Staphylococcus* produzem, também, uma grande variedade de toxinas extracelulares e de fatores de virulência, os quais estão relacionados a patogenicidade e aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos disponíveis. Entre esses se destaca a TSST-1, reconhecida como a principal causa

da Síndrome do Choque Tóxico em seres humanos, caracterizada por febre hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (CARDOSO et al., 2000; SÁ et al., 2004). A TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples, apresentando peso molecular de 22.000 Daltons. Possui propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas, como capacidade de induzir febre, aumentar a letalidade do choque endotóxico, estimular a proliferação inespecífica de células T e induzir a produção de interleucina-1, interferon gama e fator alfa de necrose tumoral (BERGDOLL e CHESNEY, 1991; DINGES et al., 2000; CUNHA e CUNHA, 2007).

O primeiro registro de detecção de TSST-1 produzida por *Staphylococcus* sp. de origem animal foi realizado por Jones e Wieneke no ano de 1986 (BERGDOLL e CHESNEY, 1991; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Em estudos realizados com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastites bovinas, evidenciaram que 20 a 77 % dos isolados produziram TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas. Em tanques de expansão utilizados para resfriamento e armazenamento de leite, aproximadamente 76 % das amostras de *S. aureus* isoladas apresentaram capacidade de produzir essas toxinas (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Em um estudo realizado por Cardoso et al. (2000), de um total de 127 amostras isoladas de mastite bovina 65 % apresentaram produção de pelo menos um tipo de toxina. Das toxinas identificadas, houve predomínio da TSST-1 e da enterotoxina do tipo D, sendo este trabalho considerado como o primeiro estudo a detectar a TSST-1 produzida por *S. aureus* de origem animal.

A produção de enterotoxinas por espécies de *Staphylococcus* tem sido geralmente associada à produção de coagulase e termonuclease, embora alguns autores tenham observado que algumas linhagens coagulase-negativa pertencentes às espécies *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. warneri* e *S. saprophyticus* possam ser enterotoxigênicas (SENA, 2000; CARMO et al., 2002; BORELLI, 2002). A espécie coagulase-positiva *S. intermedius*, é a espécie predominantemente isolada de alimentos, sendo que algumas linhagens são capazes, de produzir enterotoxinas (SENA, 2000; BORELLI, 2002). *S. intermedius* é a única espécie já descrita envolvida em surtos de intoxicação alimentar, devido ao consumo de produtos a base de manteiga (BORELLI, 2002).

A produção de enterotoxinas a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCO-) é importante do ponto de vista da saúde pública, porque a

Legislação Brasileira não especifica padrões para este grupo microbiano. Sena (2000) verificou a produção de enterotoxinas e TSST-1 por “pools” de SCO- em amostras de queijo coalho comercializadas em Recife-PE. Carmo et al. (2002), também verificaram a presença de linhagens de SCO- produtoras de enterotoxinas do tipo C e D, em amostras de leite cru envolvidas em um surto de intoxicação alimentar no município de Passa Quatro, MG. Borelli (2002) verificou que “pools” de SCO- isolados de amostras de leite *in natura*, “pingo”, massa coagulada e queijo Canastra foram capazes de produzir as enterotoxinas do tipo A, B, C, D e a toxina TSST-1. Esses achados ressaltam a importância da pesquisa de enterotoxinas em cepas de SCO-, mesmo não havendo previsão na legislação para este tipo de ocorrência.

Vários métodos têm sido desenvolvidos e vêm sendo utilizados para detectar enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. As principais técnicas de detecção são: o radioimunoensaio, imunodifusão, aglutinação passiva reversa “Western immunoblotting”, OSP (Sensibilidade Ótima em Placa), ELFA (Enzyme-linked Fluorescent Assay) utilizando o aparelho VIDAS, ELISA e métodos imunológicos que usam kits comerciais como por exemplo, o SET-RPLA (aglutinação em látex de fase reversa), SET-EIA (ELISA para enterotoxinas estafilocócicas “Enzyme Linked-Immunsorbent Assay”) e métodos que usam sondas de DNA (ácido desoxirribonucléico) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (SENA, 2000; BORELLI, 2002). A PCR tem sido muito utilizada para a verificação da ocorrência de microrganismos patogênicos e toxigênicos em alimentos, sendo amplamente reconhecida como um método capaz de reduzir o tempo de detecção e aumentar a sensibilidade e especificidade do resultado esperado (PINTO et al., 2005).

Estes testes baseiam-se na capacidade do antígeno (enterotoxina) interagir com os anticorpos e formar um precipitado denominado precipitina. O complexo antígeno-anticorpo incorporado em uma placa ou tubo contendo ágar ou uma agarose como suporte propicia o aparecimento do precipitado, sendo que a distância percorrida por esta reação é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra (ORNELAS, 2005).

Segundo Cunha Neto et al. (2002) a técnica imunoenzimática, ELFA é bastante utilizada por conseguir detectar uma quantidade mínima de enterotoxinas, através do equipamento VIDAS. Esta técnica consiste basicamente na utilização de

um leitor de fluorescência que emite luz com comprimento de onda a 450 nm. São utilizados anticorpos policlonais e a enzima fosfatase alcalina, diferenciando desta forma da técnica ELISA.

Um outro método muito utilizado é OSP, que utiliza o princípio da imunodifusão em gel (Robbins et al., 1974, apud ORNELAS, 2005). Este método é considerado adequadamente sensível para a identificação de linhagens enterotoxigênicas e avaliação da produção de enterotoxinas pelas técnicas de Membrana de Diálise sobre ágar, Cultivo em Frasco com Tubo de Diálise e Cultivo em Frasco sob Agitação. Este método apresenta limites de sensibilidade de 0,5 µg/mL, podendo, contudo chegar até 0,1 µg/mL, desde que haja concentração do sobrenadante do cultivo (CARMO, 2001; ORNELAS, 2005).

Entre todos os métodos propostos, o teste de OSP tem sido preferido por diversos pesquisadores, não só pelos resultados obtidos como também pela simplicidade na execução, eficiência e aplicabilidade (CARMO, 2001).

## 2.7 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O termo antibiótico tem a origem em duas palavras gregas, “anti” e “bio”, que significa “contrário a vida” e foi introduzido por Waksman em 1947, para designar a substância química de origem microbiana capaz de inibir o crescimento de microrganismos ou destruí-los (SOUZA et al., 2005; YOSHIDA-JR et al., 2000). Atualmente, os antibióticos em geral são compostos caracterizados pela atividade contra microrganismos patogênicos. Apresentam toxicidade relativamente baixa para seres humanos e outros animais e são resistentes a inativação por enzimas e fluidos corpóreos (SOUZA et al., 2005).

Os antimicrobianos podem ser classificados quanto a sua atuação em bacteriostático, que causa apenas inibição do crescimento microbiano sem levar o microrganismo à morte, ou bactericida, que destrói o microrganismo (SOUZA et al., 2005). Os antibióticos e outros agentes quimioterapêuticos podem se agrupar ainda de acordo com a sua estrutura química e mecanismos de ação (YOSHIDA-JR et al., 2000).

Com a introdução da antibioticoterapia, houve uma sensível redução nas taxas de mortalidade provocadas por infecções bacterianas, incluindo as causadas por *S. aureus*. Entretanto, populações de *S. aureus* resistentes foram sendo selecionadas à medida que novas drogas eram desenvolvidas e introduzidas no tratamento das infecções. Atualmente, cepas com resistência a múltiplas drogas de uso clínico estão emergindo e conseqüentemente, dificultando o tratamento destas infecções (TAVARES, 1996; LOWY, 2003).

Na década de 40, a penicilina foi introduzida na terapia de doenças infecciosas bacterianas. Nesta ocasião, mais de 94 % das amostras de *S. aureus* eram susceptíveis à penicilina. Porém, o uso intenso e inapropriado deste agente antimicrobiano levou a um aumento acentuado no número de amostras resistentes. Em 1948, mais de 50 % das cepas de *S. aureus* isoladas de infecções hospitalares eram resistentes e este número subiu ainda mais nos anos subseqüentes para 80 a 90%. O cloranfenicol, a eritromicina, a estreptomicina e a tetraciclina foram desenvolvidos logo após a penicilina. Da mesma forma, cepas resistentes a estas drogas surgiram e tornaram-se um grande problema em muitos hospitais no final da década de 50 (LIVERMORE, 2000; LOWY, 2003). Assim, para combater as infecções estafilocócicas, surgiram as penicilinas semi-sintéticas anti-estafilocócicas: a oxacilina em 1959 e a meticilina em 1960, das quais não são inativadas pelas betalactamases estafilocócicas. Em 1961, uma penicilina resistente à ação das enzimas responsáveis pela resistência à penicilina (penicilinases), denominada de meticilina, chegou ao mercado. Contudo, amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram observadas neste mesmo ano. As cepas de MRSA apresentam resistência a estas drogas, resistência esta que envolve a produção de uma nova proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês: Penicillin-Binding Protein), a PBP2a ou PBP2'. A PBP2a catalisa a transpeptidação e carboxipeptidação do peptidoglicano da parede celular bacteriana, assumindo as funções das PBPs normais dos estafilococos, quando a bactéria resistente se encontra na presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (LIVERMORE, 2000; TAVARES, 1996; MARTINS e CUNHA, 2007)

No início da década de 1970, surgiram na Austrália cepas de *S. aureus* com múltipla resistência. Estas cepas rapidamente se espalharam pelo mundo, constituindo, na atualidade de 30 a 60 % das cepas isoladas, especialmente em hospitais de grande porte. Este fato tem levado a um grave problema terapêutico,

principalmente para o tratamento das infecções estafilocócicas adquiridas em ambiente hospitalar (TAVARES, 1996). No final da década de 70, houve uma grande redução da prevalência de cepas MRSA. Provavelmente, esta redução ocorreu em parte, devido ao uso da gentamicina, sendo que a resistência a esta droga logo emergiu. Nos anos 80, as cepas de MRSA voltaram a se disseminar e eram freqüentemente resistentes a múltiplas drogas e muitas vezes sensíveis somente à vancomicina (MARTINS e CUNHA, 2007). Os antibióticos do grupo dos glicopeptídios (vancomicina e teicoplanina) passaram a constituir uma das principais opções terapêuticas nas infecções estafilocócicas em ambiente hospitalar. A vancomicina foi introduzida na clínica em 1958. A utilização desta droga aumentou consideravelmente nos últimos 20 anos, em decorrência do aumento da prevalência de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativo resistentes à oxacilina (TAVARES, 1996; SOUZA et al., 2005).

Mais uma vez, o *S. aureus* mostrou sua habilidade de adquirir resistência aos antibióticos com a seleção de cepas resistentes à vancomicina, a qual constitui o principal tratamento de infecções causadas por MRSA. Inicialmente, foram descritas cepas com resistência intermediária à vancomicina (VISA), mas há relatos na literatura de casos de *S. aureus* resistentes a oxacilina e a vancomicina/teicoplanina, sendo portadores do gene *mecA* e do gene *vanA* respectivamente (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2002).

A excessiva utilização de antibióticos, desde a sua descoberta, no tratamento de infecções bacterianas, vem provocando a seleção e ampla disseminação de diferentes espécies de bactérias de importância clínica, resistentes a múltiplos antibióticos (SENA, 2000).

A resistência a agentes antimicrobianos é, portanto, uma importante estratégia de adaptação bacteriana que tem se espalhado pelo mundo. O surgimento de uma linhagem bacteriana resistente a um novo tipo de antibiótico em uma região, freqüentemente resulta em impacto mundial em curto período de tempo (LOWY, 2003; SOUZA et al., 2005). Esta situação é grave e preocupante e requer não somente a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas como o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas (RAPINI et al., 2004).

Um aumento na incidência de amostras bacterianas resistentes a agentes antimicrobianos é observado também entre bactérias isoladas de animais principalmente daqueles destinados à produção de alimentos. Este aumento tem sido atribuído principalmente ao uso intenso de agentes antimicrobianos nas práticas veterinárias.

A vigilância da resistência antimicrobiana é um dos passos essenciais para o desenvolvimento de estratégias de controle visando à eficiência da terapia antimicrobiana e minimização dos riscos para a saúde pública.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CEPA DE REFERÊNCIA

A Cepa utilizada como padrão neste trabalho foi: Cepa bacteriana (BAC-FAR) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cultivada pela Cefar Diagnóstica de cepas derivadas do ATCC, lote: J 6925.

#### 3.2 AMOSTRAGEM

Foram coletadas três amostras em cada uma das duas pequenas propriedades rurais, previamente selecionadas, estas propriedades não serão destacadas. A integridade dos produtores deverá ser mantida. Na propriedade “A” a produção do queijo Minas frescal foi derivada do leite *in natura* e a outra a partir de leite pasteurizado. Estas coletas foram realizadas, no período de novembro de 2006 a abril de 2007. Os queijos foram produzidos a partir do leite ordenhado no dia. No momento da coleta na propriedade “A” foi observado o local de ordenha, armazenamento e transporte do leite para o local de fabricação do queijo e o processo de manipulação (fig. 1, 2 e 3). Na propriedade “B” o leite era adquirido de outra propriedade, portanto, foi observada a recepção do leite, o transporte para o local da pasteurização e o processo de fabricação do queijo (fig. 4, 5). As amostras coletadas de leite *in natura*, leite pasteurizado, queijo e swabs foram acondicionadas em caixas térmicas, sob refrigeração, e levadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFT, onde foram analisadas quanto a presença, contagem, isolamento e identificação de *S. aureus*.



Figura 1. Propriedade “A” - Local da ordenha, a seta indica o local de coleta do leite.



Figura 2. Propriedade “A” - Local de manipulação dos queijos.



Figura 3. Processo de fabricação do queijo Minas fresco na Propriedade “A”. a- filtragem do leite; b- adição do coalho + salga; c- 1ª corte da coalhada; d- 2ª corte da coalhada; e- retirada do soro; f- enformagem; g- prensagem; h- queijo pronto para comercializar.



Figura 4. Propriedade “B” - chegada do leite de outra propriedade em galões após a ordenha



Figura 5. Processo de fabricação do queijo Minas frescal na Propriedade “B”. a - início da pasteurização; b- pasteurização; c- filtragem; d- adição do cloreto de cálcio; e- 1º corte da coalhada; f- 2º corte da coalhada; g- retirada do soro; h- enformagem; i- queijo pronto para comercialização.

### 3.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

#### 3.3.1 Isolamento e identificação bioquímica de *S. aureus*

##### 3.3.1.1 Preparo da amostra

- Os testes foram realizados de acordo com metodologias propostas por Kloos (1990), Sena (2000), Lancette e Bennett (2001) e Lisita (2005). Todos os testes foram realizados com três repetições.
- Leite – Foram homogeneizadas exatamente 25 mL da amostra em 225 mL de água peptonada Tamponada (MERCK) 0,1 %, estéril, para a obtenção da diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram preparadas diluições seriadas até  $10^{-6}$ . Posteriormente, foram inoculados 100  $\mu$ l de cada diluição e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski em placas contendo o meio Baird-Parker (ACUMEDIA) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas invertidas, por 48 h, a 37 °C (BERGDOLL, 1990; CARMO et al., 2002).
- Queijo – 25 g das amostras foram pesadas, homogeneizadas com o auxílio de bastão de vidro, em 225 mL de água peptonada Tamponada 0,1 %, estéril. A partir deste volume foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-6}$ . Em seguida, um alíquota de 100  $\mu$ l das diluições foram plaqueadas em ágar BP e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas, por 48 h, a 37 °C (BERGDOLL, 1990; CARMO et al., 2002).
- Manipuladores – A coleta dos swabs das cavidades nasais e leitos subungueais foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por CARMO et al. (2003). Os swabs coletados foram transferidos para tubos contendo caldo triptona de soja (TSB) (ACUMEDIA) acrescido de 10 % de NaCl e incubados por 24 h a 37 °C. Posteriormente, as amostras foram plaqueadas em ágar BP e incubadas invertidas por 48 h a 37 °C.

### 3.3.1.2 Isolamento e enumeração de *Staphylococcus* sp.

Para a quantificação de *Staphylococcus* sp. foram contadas às placas que apresentaram entre 20 a 200 colônias suspeitas de *Staphylococcus* sp. O resultado foi multiplicado pelo inverso da diluição e posteriormente por 10 e este resultado sendo representado por UFC/mL ou UFC/g da amostra. Foram pescadas e purificadas dez colônias que apresentaram a morfologia típica de *S. aureus* no ágar BP (coloração negra, com brilho, puntiforme e circundada por um halo de lipase e outro transparente mais externo de lecitina), (fig. 6.). E em seguida estas foram recuperadas e coradas pelo método de Gram (LANCETTE e BENNETT, 2001). As colônias selecionadas foram transferidas para ágar triptona de soja (TSA) (ACUMEDIA), mantidas a 4 °C e em caldo infuso de cérebro–coração (BHI) (MERCK), acrescido de 50 % de glicerol (v/v) e mantidos a – 80 °C (CARDOSO et al., 2000, CARMO et al., 2003).



Figura 6. Colônias típicas de *S. aureus* em ágar BP

### 3.3.2 Identificação bioquímica do microrganismo

As cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas das amostras foram submetidas a testes bioquímicos para identificação das espécies. Foram realizados os testes de fermentação aeróbia de açúcares (manitol e maltose), coagulase, catalase,

termonuclease (TNase) e hemólise, segundo metodologias propostas por MAC FADDIN (1980), SENA (2000) e KONEMAN et al. (2001).

### 3.3.2.1 Prova da Catalase

Esta é uma prova usada com frequência para diferenciar membros da família Micrococcaceae de membros da família Streptococcaceae. As colônias foram incubadas em caldo BHI, durante 24h, a 37 °C e em seguida transferidas para lâminas de microscopia, onde foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3 %. Os *Staphylococcus* spp. possuem a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água e oxigênio ao contrário do gênero *Streptococcus*. O aparecimento rápido e a produção sustentada de bolhas de gás ou efervescência constituem reação positiva (KONEMAN et al., 2001) (fig. 7.).

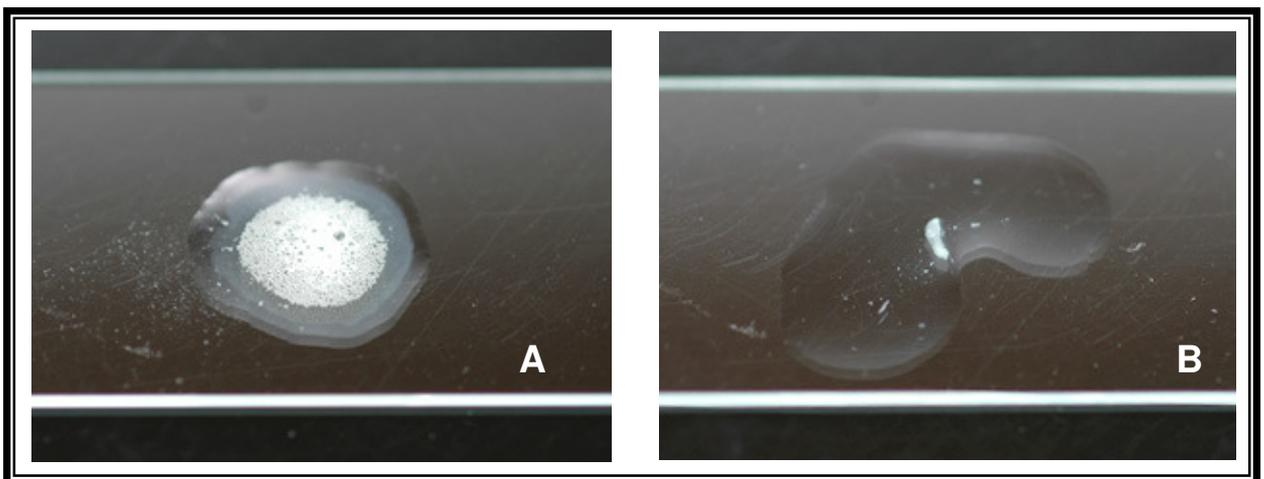


Figura 7. Prova da catalase : a- reação positiva; b- reação negativa

### 3.3.2.2 Prova da Coagulase

A coagulase é uma enzima de composição química desconhecida, com atividade similar à protrombina, capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo visível. A prova de coagulase foi utilizada para diferenciar *S. aureus* das outras espécies do gênero *Staphylococcus* (KONEMAN et al., 2001). O teste foi realizado adicionando-se 0,5 mL, da cultura em caldo BHI a 0,5 mL de solução de plasma de coelho (LABORCLIN), acrescido de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), diluído em solução salina estéril (NaCl

0,85% p/v) na concentração de 1:3, conforme protocolo do fabricante, e incubado a 37° C, por 4 ou até no máximo 24hs. Reações positivas produziram a formação de coágulo (fig. 8.).

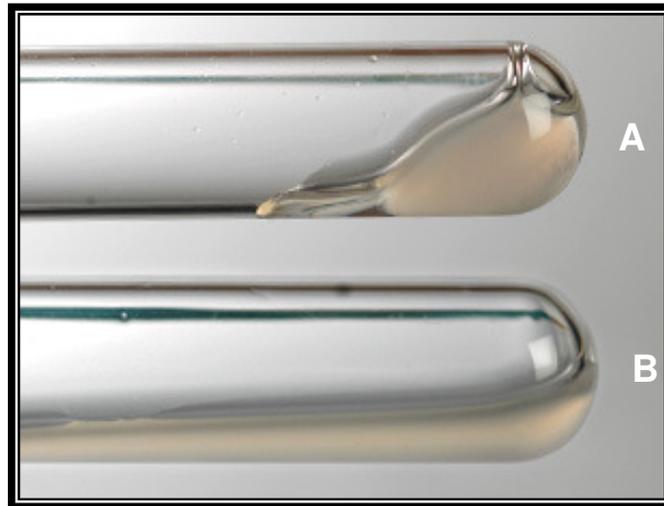


Figura 8. Prova da coagulase: a- reação positiva; b- reação negativa

### 3.3.2.3 Prova da Termonuclease (TNase)

Algumas espécies de *Staphylococcus* produzem uma série de enzimas extracelulares, dentre elas está a TNase. Esta enzima possui a capacidade de quebrar o DNA produzindo 3'-fosfomonucleosídeos (porção fosfórica do DNA, o qual é ácido). O meio utilizado para este teste foi o ágar azul de toluidina (VETEC), que possui pH básico. Quando há liberação da porção ácida do DNA, resultante de sua degradação, o ágar se torna róseo, considerando-se a prova positiva (CARMO, 1998).

As amostras foram aquecidas a 100 °C, por 15 min., e resfriadas. Em seguida foram colocadas em orifícios de aproximadamente 2 mm no ágar Azul de O-toluidina-DNA, em lâminas de microscopia. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 37 °C, por 4 ou até no máximo 24 hs. A reação positiva apresentou formação de um halo róseo ao redor da cavidade do ágar (fig. 9.).

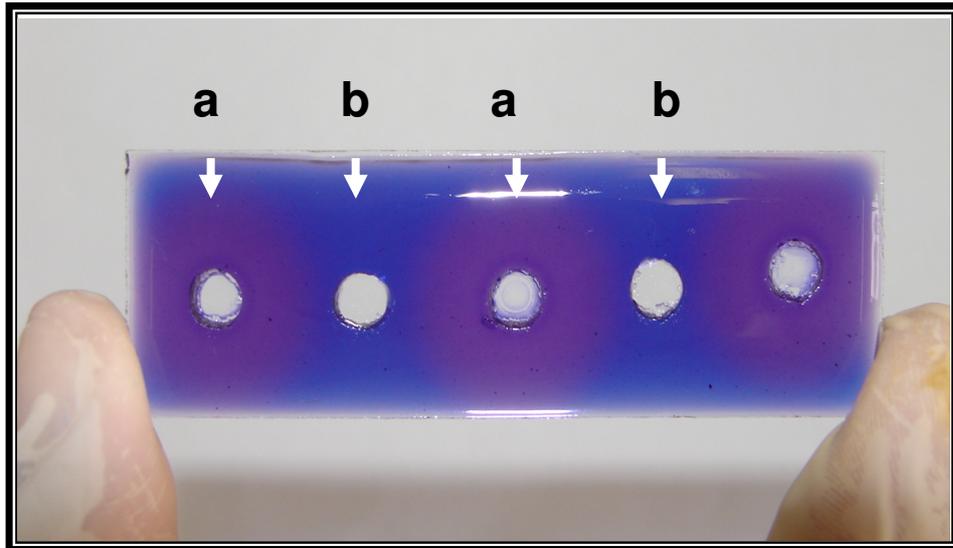


Figura 9. Prova da TNase: a- reação positiva; b- reação negativa

#### 3.3.2.4 Prova da Hemólise

Uma prova que deve ser realizada para a diferenciação das principais espécies de estreptococos é a produção de lise das hemácias presentes no ágar sangue. A hemólise é classificada em hemólise total (beta-hemólise) caracterizada pela formação de uma zona clara ao redor das colônias, hemólise parcial (alfa-hemólise) caracterizada pela formação de um halo esverdeado ao redor da colônia e ausência de hemólise (gama-hemólise) quando não há alteração do meio ao redor da colônia (KONEMAN et al., 2001).

As amostras foram estriadas em ágar sangue de carneiro 5 % e incubadas a 37 °C por 24 hs. A formação de halos indicou a capacidade do microrganismo em lisar hemácias (fig. 10). Este teste é utilizado para auxiliar a diferenciação entre *S. aureus* (hemólise +) de outras espécies do gênero (Kloos, 1990).

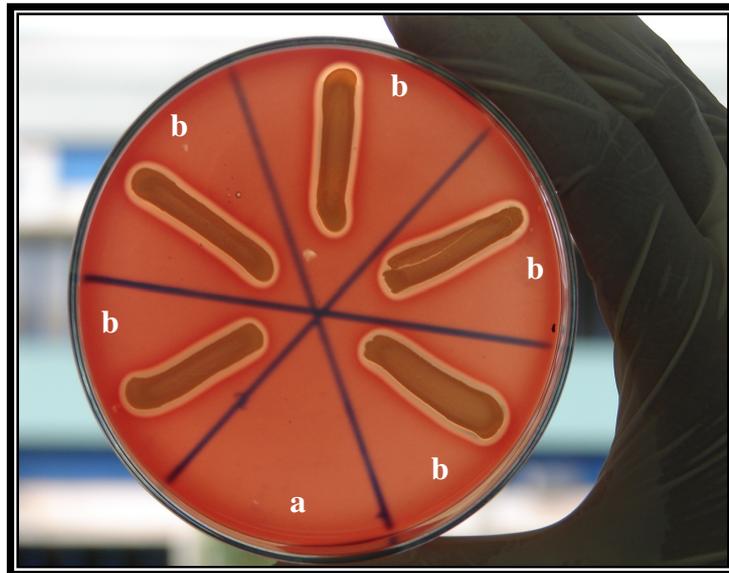


Figura 10. Prova da hemólise: a- controle negativo; b- cepas positivas

### 3.3.2.5 Fermentação de Açúcares

Existem espécies de *Staphylococcus* que possuem a capacidade de utilizar os açúcares maltose e/ou manitol como fonte de carbono, tendo como produto desta reação a formação de ácido láctico. Para a realização dos testes foram utilizados meios alcalinos e que possuem como indicador, o corante púrpura de bromocresol (roxo) (MERCK). Quando há formação de ácido pelo microrganismo o meio torna-se amarelo, devido à mudança no pH (CARMO, 1998).

As amostras foram estriadas em FAM manitol (Fermentação aeróbia de manitol) (VETEC) e FAM maltose (Fermentação aeróbia de maltose) (VETEC) e incubadas a 37 °C por 24 hs. As provas em ágar FAM maltose e ágar FAM manitol foram consideradas positivas quando houve formação de halos de cor amarela ao redor do crescimento do microrganismo, indicando a fermentação dos açúcares pelo microrganismo (fig.11).

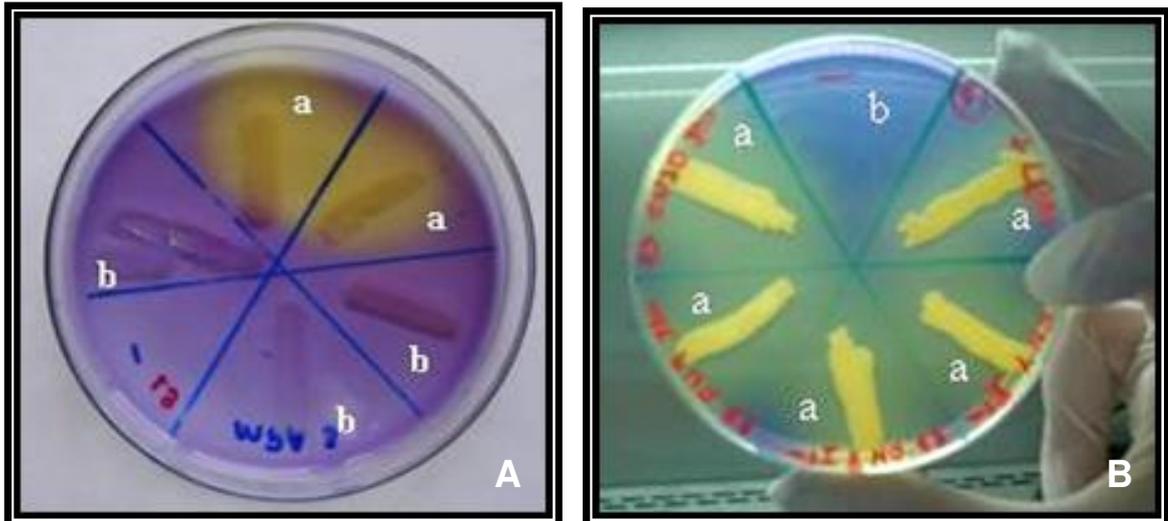


Figura 11. (A) Prova bioquímica da FAM manitol: a- reação positiva; b- reação negativa / (B) FAM maltose: a- reação positiva; b- reação negativa

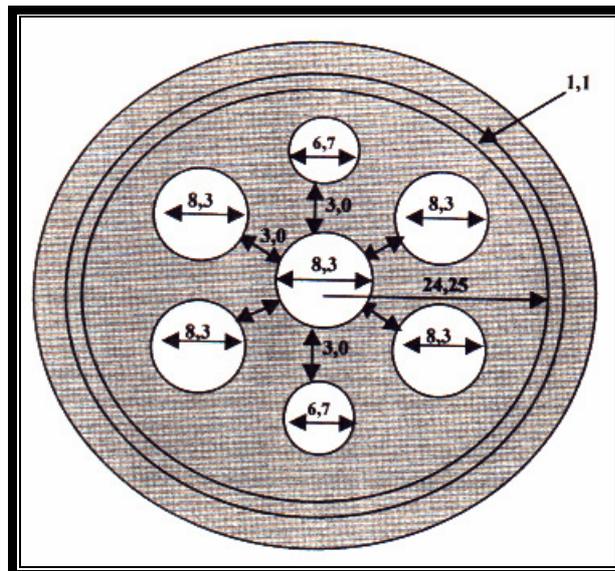
### 3.3.3 Pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas

A pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas foi realizada no Laboratório de enterotoxinas estafilocócicas da FUNED, no próprio alimento (queijo), após extração da mesma. Para tanto, foram pesados 25 g do alimento e foram adicionados 40 mL de água destilada estéril pré incubada a 37 °C. Misturando-se rapidamente durante 3 min. para se obter uma suspensão homogênea. Esta suspensão ficou em repouso por 30 min., em temperaturas entre 18 °C e 25 °C. Posteriormente, verificou-se o pH do líquido filtrado sendo este ajustado entre 3,5 a 4, com ácido clorídrico (HCl) 5N. Centrifugou-se a suspensão a 5.000 rpm, durante 15 min. a 18 °C. A suspensão foi filtrada com uma gaze para remover a camada de gordura, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pH verificado novamente, sendo ajustado para 7,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 5N. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 5.000 rpm durante 15 min., à temperatura de 25 °C, sendo em seguida novamente filtrado em gaze para remoção da camada de gordura. Após este procedimento, o sobrenadante foi transferido para um frasco de vidro, com tampa, e acrescido de 20 µl de timerosol 1:1.000 como conservante. A metodologia utilizada foi baseada no POP LEA - Met 0009/01 da Divisão de Vigilância Sanitária (DIVISA) do Instituto Octávio Magalhães (IOM)– Fundação Ezequiel Dias – FUNED (FUNED, 2007).

O sobrenadante foi utilizado para averiguação de produção de enterotoxinas pelos métodos de OSP (ROBBINS et al.1974 apud ORNELAS, 2005) e ELFA (CUNHA NETO et al., 2002).

### 3.3.3.1 Detecção de enterotoxinas pelo Método de OSP

Os extratos obtidos foram submetidos ao método de OSP, de acordo com metodologia proposta por Robbins et al. (1974) (apud ORNELAS, 2005). Neste método, 3,5 mL de ágar nobre a 1,2 % (p/v) preparado em tampão PBS 0,02 M (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4 e acrescidos de 1,0 mL de timerosol como conservante, foram colocados em placas de Petri de 50 x 12 mm. Após a solidificação, foram realizados sete orifícios no ágar, conforme o molde (fig. 12) sendo cinco furos de 8,3 mm e dois medindo 6,7 mm. Nos dois orifícios menores foram colocados 4 µg/mL de uma toxina padrão e no orifício central, um anti-soro específico, com título conhecido, de forma que as linhas de precipitina formadas pela reação antígeno/anticorpo, se situassem na metade da distância entre estes. Nos quatros orifícios externos foram adicionadas as amostras teste. As reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina do sobrenadante da cultura teste com o anti-soro controle (fig.13).



Fonte: SENA, 2000

Figura 12. Molde segundo o “Food Research Institute” usado no teste de OSP (medidas em mm).



Fonte: ORNELAS, 2005

Figura 13. Placa utilizada para realização do teste OSP, mostrando orifícios: 1 e 4 – toxina padrão; 7- anti-toxina; 2, 3, 5 e 6 – amostras positivas para a enterotoxina testada.

#### 3.3.3.2 Detecção de enterotoxinas pelo método ELFA

O método ELFA é um teste imunoenzimático, que permite a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente no aparelho VIDAS ou mini-VIDAS (bioMérieux Inc. France). O kit VIDAS SET "Staph Enterotoxin II" é composto de cones e barretes. O cone é sensibilizado pelo fabricante com anticorpos monoclonais específicos das enterotoxinas estafilocócicas adsorvidos na sua superfície. Os barretes são compostos por dez poços cobertos por uma folha de alumínio, sendo que o primeiro poço apresenta uma parte perfurada onde é colocada a amostra teste, os poços intermediários contem os reagentes necessários para a análise, e o último poço é o que permite a leitura em fluorescência (figs. 14 e 15) (BIOMERIEUX S.A., 2004).

Após o procedimento da extração das enterotoxinas foi retirada uma alíquota de 500 µl do filtrado e colocado no primeiro poço do barrete. Conforme metodologia descrita pelo fabricante, a amostra teste foi submetida a ciclos de aspiração e dispersão para ativar a reação. Todas as etapas do teste são realizadas automaticamente pelo aparelho. Na etapa final da reação realiza-se uma leitura de

fluorescência medida a 450 nm. Após este processo os resultados são calculados automaticamente pelo sistema, que fornece um valor teste e um relatório impresso para cada amostra. Este valor é comparado com uma referência e cada resultado é interpretado como negativo ou positivo. O aparelho efetua duas leituras. A primeira leitura corresponde ao branco. A segunda é efetuada após a incubação do substrato com a enzima presente no cone. O cálculo do Valor Relativo da Fluorescência (RFV) é o resultado da diferença das duas medidas. As enterotoxinas do tipo A, B, C (C1, C2, C3), D e E são detectadas desde que apresentem concentração superior a 0,25 ng/mL.

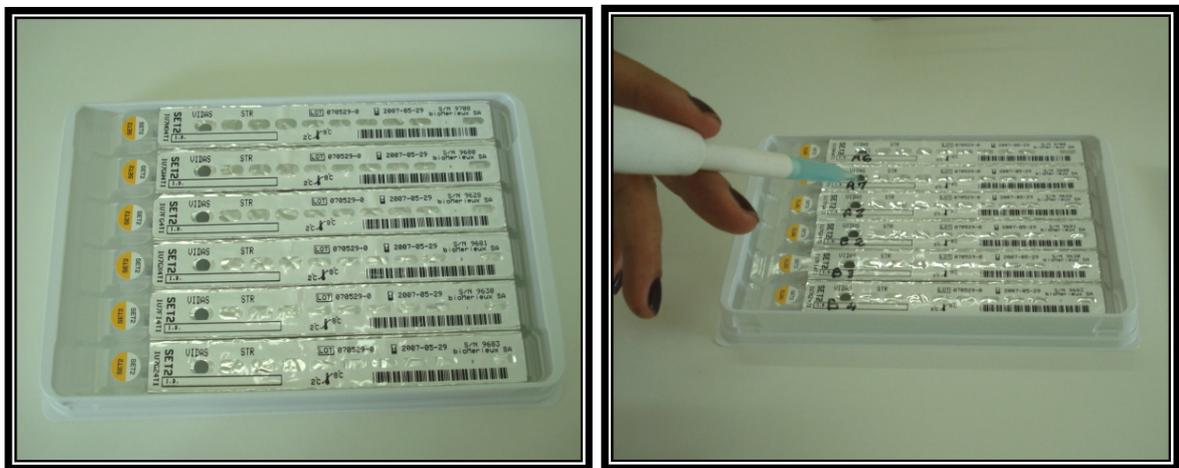


Figura 14. Barretes utilizados para a técnica ELFA no aparelho mini-VIDAS (bioMérieux)

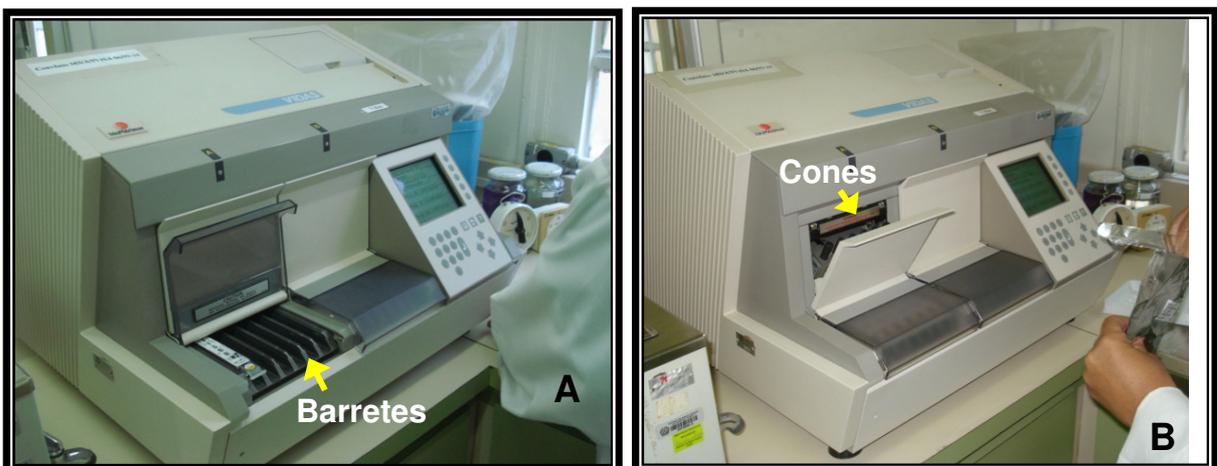


Figura 15. Aparelho mini-VIDAS, localização dos barretes e dos cones: A- barretes; B- cones

### 3.3.4 Avaliação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foi determinada através do método de difusão em ágar segundo as recomendações do “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS) para amostras de origem animal (NCCLS, 2002).

Suspensões bacterianas em solução salina estéril (0,9% em p/v) ajustadas a uma turvação equivalente ao grau 0,5 da escala de McFarland, foram obtidas a partir do crescimento de um pool das cepas isoladas, da mesma amostra, com o perfil bioquímico de *S.aureus* em meio de ágar sangue durante 18-24 h., a 37 °C, em aerobiose. As suspensões foram semeadas com o auxílio de swab estéril sobre a superfície de placas contendo meio ágar Mueller Hinton (DIFCO) para obtenção de um crescimento confluyente. Após a absorção da cultura pelo meio, os discos com antibióticos (Cecon) foram depositados com o auxílio de uma pinça estéril e as placas incubadas a 35 °C, por 24 hs., em aerobiose.

Os agentes antimicrobianos testados foram: cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), Trimetropim - sulfametoxazol (25 µg) vancomicina (30 µg) ampicilina (10 µg), clindamicina (2 µg) (Cecon), todos recomendados pelo NCCLS (NCCLS, 2002).

Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram medidos, utilizando-se régua milimétrica, para interpretação dos resultados (fig. 16). Os microrganismos foram registrados nas categorias: resistente, intermediário ou sensível, de acordo com os critérios interpretativos do NCCLS (2002), e do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006).



Figura 16. Representação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos

### 3.3.5 Elaboração da cartilha

A elaboração da cartilha - Manipulador de derivados do leite - teve como base as Legislações Brasileiras: RDC 275 de 21 de outubro de 2002 – ANVISA /MS, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos; RDC 216 de 15 de setembro de 2004 – ANVISA/MS, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de alimentação e a Portaria 518 de 14 de junho de 2002 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), que dispõem sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal. Foi também elaborada com base no Manual de higiene para manipuladores de alimentos (HAZELWOOD e MCLEAN, 1994).

### 3.3.6 Análise dos resultados

Para o resultado da enumeração de *S. aureus* (UFC/mL e/ou UFC/g) foi usada a metodologia proposta por Silva et al. (2001), de maneira que o número de colônias típicas e atípicas contadas de uma mesma placa foi multiplicado pelo fator de

diluição e posteriormente pela quantidade de inóculo utilizado. Para a confirmação da quantidade de *S. aureus* a metodologia utilizada foi baseada no POP LMA-Met 0005/01 da Divisão de Vigilância Sanitária (DIVISA) do Instituto Octávio Magalhães (IOM) – Fundação Ezequiel Dias – FUNED, que consiste na aplicação de uma regra de três simples.

$Y = n^{\circ} \text{ de colônias contadas} \times n^{\circ} \text{ de colônias confirmadas} \times \text{fator de diluição da placa} / n^{\circ} \text{ colônias pescadas.}$

Onde : Y (espécie pesquisada) (FUNED, 2003).

Para a interpretação dos dados foi aplicada a análise estatística descritiva. A estatística descritiva teve como objetivo básico sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo dessa forma que se tivesse uma visão global da variação desses valores. Esta análise estatística visa organizar e descrever os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e de medidas descritivas (VIEIRA, 1980).

A tabela é um quadro que resume um conjunto de observações, enquanto os gráficos são formas de apresentação dos dados, cujo objetivo é o de produzir uma impressão mais rápida e viva do fenômeno em estudo (VIEIRA, 1980).

A média aritmética é a soma de todos os valores observados da variável dividida pelo número total de observações. Percentagem ou porcentagem é uma medida de razão com base 100. É um modo de expressar uma proporção ou uma relação entre 2 valores (um é a parte e o outro é o inteiro) a partir de uma fração cujo denominador é 100 (VIEIRA, 1980).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Staphylococcus* sp. ISOLADAS DO LEITE *IN NATURA* E LEITE PASTEURIZADO

Todas as amostras de leite *in natura* analisadas (06) foram positivas para a presença de *Staphylococcus* sp.. A maioria das 60 cepas isoladas foram caracterizada como coagulase positiva sendo que destas, 46 foram identificadas através de provas bioquímicas como *S. aureus*, 5 como SCO+ e somente 9 isolados foram identificados como SCO-. No leite cru da propriedade “B” foi observada uma maior prevalência de *S. aureus* (tab. 1).

Tabela 1. Frequência de *Staphylococcus* sp. isolados de leite *in natura* nas propriedades “A” e “B”.

Propriedade	N	<i>S. aureus</i>	SCO+	SCO-
A	30	21	5	4
B	30	25	0	5
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>46</b>	<b>5</b>	<b>9</b>

N = Tamanho da amostra

A ocorrência de *S. aureus* e de algumas cepas coagulase positivas (*S. intermedius*) em alimentos como leite e derivados é comum, pelo fato de serem encontrados naturalmente na microbiota de animais como cabras, vacas e ovelhas. O *S. aureus* é uma das espécies encontradas com a maior frequência no úbere desses animais com mastite clínica e subclínica (SENA, 2000; STAMFORD et al., 2006).

Das amostras de leite *in natura* provenientes da Propriedade “A”, foram obtidas contagens de  $10^5$  UFC/mL de *S. aureus*. Sendo que na primeira coleta obteve-se uma contagem de  $2,6 \times 10^5$  para SCO+ UFC/mL. Nas demais coletas não foram observadas a presença deste microrganismo. Na Propriedade “B” a contagem para *S. aureus*, variou de  $3,4 \times 10^6$  a  $5,5 \times 10^7$ , não sendo observado outros microrganismos coagulase positiva (tab. 2). Estes resultados evidenciam um número

elevado deste microrganismo e indicam que a matéria prima utilizada na fabricação do queijo não se encontrava em condições higiênico-sanitárias adequadas.

Tabela 2. Enumeração das espécies de *Staphylococcus* (UFC/mL) em amostras de leite *in natura* isoladas das propriedades “A” e “B”

<b>Espécies</b>	<b>1ª coleta UFC/mL</b>	<b>2ª coleta UFC/mL</b>	<b>3ª coleta UFC/mL</b>
<b>Propriedade A</b>			
<i>S. aureus</i>	1x10 <sup>5</sup>	5,8x10 <sup>5</sup>	6,6x10 <sup>5</sup>
SCO+	2,6x10 <sup>5</sup>	—	—
<b>Propriedade B</b>			
<i>S. aureus</i>	5,5x10 <sup>7</sup>	3,4x10 <sup>6</sup>	7,9x10 <sup>6</sup>

Assumpção et al. (2003), ao analisarem 5 amostras de leite cru em um Laticínio de Lavras MG, observaram que 4 delas apresentaram contagens de SCO+ e de *S. aureus* superiores a 4 x 10<sup>3</sup> UFC/mL, sendo que, em uma amostra os valores foram de 4,8 x 10<sup>6</sup> UFC/mL e de 3,3 x 10<sup>5</sup> UFC/mL de contagens de SCO+ e de *S. aureus* respectivamente.

Temelli et al. (2005), ao avaliarem as principais fontes de contaminação durante a fabricação de um queijo turco observaram que no leite cru as contagens de *Staphylococcus* sp. estavam acima de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Gomes e Gallo (1995) encontraram contagens de *S. aureus* superiores a 10<sup>3</sup> UFC/mL em amostras de leite cru comercializadas em Piracicaba - SP. Normanno et al. (2005) analisando 9.869 amostras de produtos de origem animal comercializadas na Itália, entre elas 437 amostras de leite cru, observaram que 168 (38,4 %) estavam contaminadas com SCO+, sendo que em 94 (55,9 %) foram detectadas cepas de *S. aureus*. O *Staphylococcus* sp. pode alcançar o leite através da excreção direta pelo úbere das vacas com mastite clínica ou subclínica ou por contaminação.

A elevada contagem desses microrganismos potencialmente produtores de enterotoxinas e a grande estabilidade delas ao calor são fatores preocupantes. Segundo Corbia et al. (2000) e Carmo et al. (2002) concentrações desses microrganismos acima de 10<sup>5</sup> UFC/mL ou UFC/g de produto são consideradas

suficientes para a produção de toxinas estafilocócicas em níveis propícios para ocorrência de intoxicação alimentar em pessoas que venham a consumir o leite ou seu derivado. No entanto, Corbia et al. (2000), descreve que Silva e colaboradores, em 1981, observaram que havia produção de enterotoxinas por *S. aureus* em populações variando de  $10^4$  UFC/g a  $10^6$  UFC/g de alimento.

O controle higiênico-sanitário do rebanho e da ordenha é fundamental para garantir a qualidade nutricional e microbiológica do leite cru (SENA, 2000).

A Instrução Normativa nº. 22 (BRASIL, 2003) possui vários procedimentos que devem ser adotados para obtenção de leite de qualidade. As tetas do animal a ser ordenhado devem sofrer prévia lavagem com água corrente, seguindo-se secagem com toalhas descartáveis e início imediato da ordenha, com descarte dos jatos iniciais de leite em caneca de fundo escuro ou em outro recipiente específico para essa finalidade. Em casos especiais, como os de alta prevalência de mastite causada por microrganismos do ambiente, podem-se adotar o sistema de desinfecção das tetas antes da ordenha, mediante técnica e produtos desinfetantes apropriados, adotando-se rigorosos cuidados para evitar a transferência de resíduos desses produtos para o leite (secagem criteriosa das tetas antes da ordenha). Após a ordenha, desinfetar imediatamente as tetas com produtos apropriados. Os animais devem ser mantidos em pé, pelo tempo suficiente para que o esfíncter da teta volte a se fechar. Para isso, recomenda-se oferecer alimentação no cocho após a ordenha. O leite obtido deve ser coado em recipiente apropriado de aço inoxidável, náilon, alumínio ou plástico atóxico. O local de ordenha deve ser mantido sob rigorosas condições de higiene sendo obrigatória a lavagem das mãos do ordenhador, em água corrente, seguida de imersão em solução desinfetante apropriada, antes de iniciar a ordenha de cada animal. Na ordenha, deve ser usado balde de abertura lateral, sem costuras ou soldas que dificultem a limpeza e sanitização. As vacas com mastite devem ser ordenhadas por último e o leite não pode ser destinado para consumo humano. Considerando-se que a superfície das tetas representa uma importante fonte de contaminação, a lavagem e desinfecção dos mesmos antes da ordenha contribuem, significativamente, para a redução das contagens de bactérias mesofílicas e microrganismos patogênicos. No entanto, nem sempre estes procedimentos da Instrução Normativa nº. 22 (BRASIL, 2003) são adotados na propriedade "A", onde foi realizada a observação e o acompanhamento da ordenha

manual, dificultando, assim, a obtenção de um leite com a qualidade e segurança alimentar desejadas.

A legislação sanitária (RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001) não prevê o monitoramento de *Staphylococcus* sp. em leite *in natura*, uma vez que esta resolução estabelece padrões microbiológicos para produtos expostos a venda e não para matéria prima. No entanto, a maioria dos queijos Minas frescal são produzidos com este tipo de leite (BRASIL, 2001).

Nos leites *in natura* analisados, a detecção de *Staphylococcus* sp. foi semelhante as observadas em trabalhos similares, como já descrito anteriormente. no entanto, as concentrações deste microrganismo nos respectivos leites estavam elevadas. Os produtores deveriam ser mais atentos em relação a ordenha, seguindo a Instrução Normativa nº. 22 (BRASIL, 2003) para reduzir o risco de contaminação da matéria prima. Na propriedade "A" o local da ordenha (curral) não era apropriado para essa finalidade. Nos dias de coletas observou-se que o curral não era limpo e que o acúmulo de fezes dos animais era demasiado. Os ordenhadores não faziam a desinfecção das tetas antes e nem após a ordenha, e não era realizado controle veterinário periódico de sanidade do gado. O leite recém-ordenhado não era filtrado na hora e nem refrigerado, ficando por aproximadamente 1 h. em ambiente aberto e sem proteção contra insetos. Após este tempo, o leite era transportado ao local de fabricação dos queijos pelos próprios ordenhadores, a pé. O período em que o leite ficou sem refrigeração era suficiente para que ocorresse a multiplicação dos microrganismos, já que a temperatura ideal para o crescimento do *Staphylococcus* sp. varia de 35 °C a 40 °C, e suas enterotoxinas são produzidas entre 10 °C e 46 °C.

Na propriedade "B" o leite era adquirido de outro produtor. O leite demorava em torno de 2 hs. para chegar ao seu destino, quando era realizada a pasteurização artesanal lenta.

Nas amostras de leite pasteurizado, provenientes da propriedade "B", não foi observado o crescimento de cepas de *Staphylococcus* sp., ao contrário do observado no leite *in natura*. O processo utilizado na propriedade foi eficiente para a eliminação do microrganismo, mesmo não sendo realizada com um pasteurizador apropriado, e sim através de aquecimento em fogão industrial até atingir uma temperatura de aproximadamente 70 °C. Após esta temperatura o leite era resfriado permanecendo a temperatura ambiente, não era tampado e ficava exposto ao meio ambiente até atingir uma temperatura de aproximadamente 40 °C, para a adição do

cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na proporção de 40 mL (de uma solução a 50% (p/v)) por 100 litros de leite e da adição do coalho na proporção de 7 mL do coalho para cada 100 mL de leite (diluído em  $\frac{1}{2}$  copo de água sem cloro).

Estes dados confirmam a necessidade de se utilizar somente o leite pasteurizado na elaboração do queijo minas frescal, uma vez que um leite contaminado irá influenciar negativamente a qualidade e a segurança alimentar do produto final.

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Staphylococcus* sp. ISOLADAS DOS MANIPULADORES E ORDENHADORES

Todos os sítios estudados (fossas nasais e leitos subungueais) dos manipuladores e ordenhadores foram positivos para *Staphylococcus* sp.. Na propriedade “A” o ordenhador “1” é portador assintomático de *S. aureus* e *S. saprophyticus* nas fossas nasais e de *S. aureus* nos leitos subungueais. O ordenhador “2” é portador de *S. aureus* e SCO- nas fossas nasais e nos leitos subungueais de *S. aureus* e *S. saprophyticus*. O manipulador é portador de SCO-, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* e SCO+ nas fossas nasais e de SCO-, *S. aureus* e SCO+ nos leitos subungueais conforme descrito na tabela 3.

A propriedade “B” possui apenas um ordenhador, sendo este portador de vários microrganismos: *S. aureus*, *S. epidermidis*, SCO- e *S. saprophyticus* nas fossas nasais. Também é portador de *S. aureus*, SCO-, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* nos leitos subungueais. O manipulador apresentou positividade para as cepas *S. aureus*, *S. saprophyticus*, SCO-, *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *S. saccharolyticus* e SCO+ nos leitos subungueais. Nas fossas nasais apresentou positividade para as cepas *S. aureus*, SCO+, SCO- (tab. 4).

A frequência de *S. aureus* nas fossas nasais dos ordenhadores foi elevada, assim como nos leitos subungueais durante a ordenha, o que pode possibilitar a contaminação do leite durante este processo. Contudo, somente com a utilização de testes moleculares, como o pulsed field, (PFGE) e até mesmo o RAPD, seria possível evidenciar se a origem da contaminação do leite está associada aos ordenhadores ou se a origem das bactérias está relacionada diretamente com os animais produtores (FUEYO et al., 2001; VAUTOR et al., 2003).

Vautor et al. (2003) através da técnica de biologia molecular (PFGE) demonstraram que os *S. aureus* isoladas das mãos dos manipuladores apresentaram o mesmo perfil eletroforético das bactérias isoladas do queijo, e que em seu estudo 80 % dos fazendeiros eram portadores deste microrganismo nas fossas nasais.

Tabela 3. Frequência de isolamento de espécies de *Staphylococcus* em diferentes sítios do manipulador e ordenhadores da propriedade "A".

	Sítio de coleta	N	Espécie	F	F (%)
<b>Ordenhador 1</b>	Fossas nasais	30	<i>S. aureus</i>	30	100
	Leitos subungueais durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i>	13	43
			<i>S. saprophyticus</i>	17	57
<b>Ordenhador 2</b>	Fossas nasais	30	SCO-	9	30
			<i>S. aureus</i>	21	70
	Leitos subungueais durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i>	25	83
			<i>S. saprophyticus</i>	5	17
<b>Manipulador</b>	Fossas nasais	30	SCO-	3	10
			<i>S. aureus</i>	9	30
			<i>S. saprophyticus</i>	5	17
			<i>S. epidermidis</i>	7	23
	Leitos subungueais após assepsia	30	SCO+	6	20
			<i>S. aureus</i>	14	47
Leitos subungueais após assepsia	30	SCO-	6	20	
		SCO+	10	33	

N = Tamanho da amostra, F = frequência de isolamento, F(%) = Frequência relativa.

OBS: Foram inseridas linhas nas tabelas para uma melhor visualização dos dados, conforme sugestão da baça examinadora.

Tabela 4. Frequência de isolamento de espécies de *Staphylococcus* em diferentes sítios do manipulador e dos ordenhadores da propriedade “B”.

Sítio de coleta	N	Espécie	F	F (%)		
Fossas nasais	30	<i>S. aureus</i>	12	40		
		<i>S. epidermidis</i>	10	33		
		SCO-	2	7		
		<i>S. saprophyticus</i>	6	20		
<b>Ordenhador</b>						
Leitos subungueais durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i>	11	37		
		SCO-	6	20		
		<i>S. epidermidis</i>	5	17		
		<i>S. saprophyticus</i>	8	26		
<hr/>						
Fossas nasais	30	SCO-	3	10		
		<i>S. aureus</i>	23	77		
		SCO+	4	13		
		<i>S. aureus</i>	9	30		
		<i>S. saprophyticus</i>	7	23		
		Leitos subungueais após assepsia	30	SCO-	3	10
				<i>S. epidermidis</i>	3	10
<i>S. carnosus</i>	5			17		
<i>S. saccharolyticus</i>	1			3		
		SCO+	2	7		

N = Tamanho da amostra, F = frequência de isolamento, F(%) = Frequência relativa.

Segundo a Instrução Normativa nº. 22 (BRASIL, 2003), o local de ordenha deve ser mantido sob rigorosas condições de higiene sendo obrigatória a lavagem das mãos do ordenhador, em água corrente, seguida de imersão em solução desinfetante apropriada, antes de iniciar a ordenha de cada animal. Durante a amostragem estas atitudes não foram realizadas pelos ordenhadores das propriedades “A” e “B”, mediante informações prestadas por ele. Portanto, sendo

estas pessoas portadoras de *Staphylococcus* sp. elas podem contaminar o leite durante a ordenha e desta forma comprometer o queijo.

André et al. (2006), observaram em seu trabalho que dos quatro manipuladores avaliados da produção do queijo Minas frescal provenientes do laticínio de Goiás, três (75 %) apresentaram contaminação nas mãos e/ ou nariz no período da coleta. Das 92 amostras coletadas 31 (33,7 %) foram positivas para *S. aureus* sendo 16 (34,8 %) isolados obtidos a partir de 46 swabs da nasofaringe e 15 (32,6 %) isolados a partir de swabs das mãos. Neste trabalho, evidenciou-se que a porcentagem de contaminação era superior aos dados obtidos em outros países, como citado pelo autor os exemplos: no Kuwait, 26,6 % dos trabalhadores de um restaurante portavam *S. aureus* na nasofaringe, no Chile, 65,5 % dos manipuladores de alimentos apresentaram a bactéria na nasofaringe, orofaringe, mãos e unhas. Na Turquia, 70 % dos manipuladores estavam com as mãos contaminadas. No Brasil, estudos demonstram a presença da bactéria em manipuladores em Teresina, PI, com prevalência variando de 43,3 % a 49,5 %; em Porto Alegre, RS, de 30 % a 35,2 %. O homem é considerado portador de *S. aureus* na nasofaringe em 37,2 % da população em geral (ANDRÉ et al., 2006).

Xavier et al. (2007) em Natal/RN, demonstraram que dos 65 manipuladores de alimentos das creches municipais estudados, 23 eram portadores do *S. aureus* nas fossas nasais e na orofaringe, ou seja, uma prevalência de (35,4 %). Resultados semelhantes foram observados por Costa et al (2002) em Campo Grande-MS, onde em uma amostragem de 48 manipuladores de alimentos, verificaram que todos apresentavam positividade para *S. aureus* nas mãos, enquanto apenas 5 obtiveram resultado negativo para esta bactéria nas fossas nasais.

Na propriedade “A”, em conversas informais, observou-se que o manipulador possui conhecimentos sobre as condições higiênicas que devem ser realizadas no processo da fabricação do queijo. O mesmo informou que já havia participado de cursos em relação a tais procedimentos, porém não são empregadas as devidas providências para uma manipulação adequada, o que pode desta forma estar comprometendo a qualidade deste queijo.

Na propriedade “B” as condições para a fabricação são mais apropriadas, as instalações estão sendo reformuladas e adaptadas. Diante destes cuidados tomados pelo manipulador, provavelmente o leite está sendo contaminado pós-pasteurização, durante a manipulação e/ou demais procedimentos. Nesta propriedade o

manipulador mostrou-se disposto em adotar todas as medidas necessárias para a produção segura dos queijos.

No presente trabalho, todos os manipuladores apresentaram SCO+ nas fossas nasais e leitos subungueais mesmo após assepsia. Este fato pode explicar a detecção destas bactérias mesmo no queijo produzido com o leite pasteurizado, (tab. 5), sugerindo que provavelmente há uma recontaminação durante o processo de fabricação nas duas propriedades amostradas. No entanto, pode-se concluir que a busca de melhor produtividade e qualidade dos produtos e serviços requer também a melhoria da qualificação dos manipuladores de alimentos.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *Staphylococcus* sp. ISOLADAS DO QUEIJO MINAS FRESCAL

Todas as amostras de queijo Minas frescal analisadas foram positivas para a presença de *Staphylococcus* sp.. Na propriedade "A", das 30 cepas isoladas 21 (70 %), foram caracterizadas através de provas bioquímicas como *S. aureus*, 5 (17 %) como SCO+, 3 (10 %) isolados SCO-, e somente foi obtido 1 (3 %) isolado de *S. intermedius*. Na propriedade "B", das cepas isoladas, 18 foram identificadas como *S. aureus* (60 %), 1 SCO+ (3 %), 4 SCO- (14 %), 6 *S. epidermidis* (3 %) e 1 de *S. saccharolyticus* (tab.5).

Rodrigues et al. (1995), observaram níveis altos de contaminação por *Staphylococcus* sp em amostras de queijo Minas frescal coletados na cidade de Viçosa-MG. Em todas as amostras analisadas foi detectada a presença deste microrganismo. Araújo et al. (2002) demonstraram a presença de *Staphylococcus* sp. em 77 % das amostras de queijos comercializados no Rio de Janeiro.

Tabela 5. Freqüência de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos frescal produzidos nas propriedades “A” e “B”.

Propriedade	N	Espécie	F	F (%)
A	30	SCO+	5	17
		<i>S. aureus</i>	21	70
		<i>S. intermedius</i>	1	3
		SCO-	3	10
B	30	SCO-	4	14
		<i>S. aureus</i>	18	60
		SCO+	1	3
		<i>S. epidermidis</i>	6	20
		<i>S. saccharolyticus</i>	1	3

N = Tamanho da amostra, F = freqüência de isolamento, F(%) = Freqüência relativa.

Das 60 cepas isoladas dos queijos, 39 (65 %) foram identificadas como *S. aureus*, 7 (11 %) como SCO-, 6 (10 %) de SCO+, 6 (10 %) *S. epidermidis*, 1 (2 %) *S. intermedius* e 1 (2 %) de *S. saccharolyticus*, conforme demonstrado no gráfico 1.

Em seu trabalho Sena (2000) observou que de 377 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas dos queijos 218 (58 %) foram identificadas como *S. aureus*; 96 (25 %) como SCO-; 41 (11 %) como *S. hyicus* e 22 (6 %) como *S. intermedius*. Observou-se que a espécie mais freqüente foi a *S. aureus*.

Outras espécies de *Staphylococcus* foram também isoladas e identificadas neste estudo (Gráfico 1). Embora, *S. aureus* seja o mais comumente envolvido em surtos de intoxicação alimentar, existem registros de surtos envolvendo outras espécies como *S. intermedius* (KHAMBATY et al., 1994; BORELLI, 2002). A baixa ocorrência de intoxicação alimentar envolvendo esta bactéria pode, segundo Carmo e Bergdoll (1990), ser explicada pelo fato desta espécie não ser comumente isolada de humanos, e sim em cães, cavalos e gatos. A detecção desta espécie demonstra a existência de outras possíveis fontes de contaminação do queijo Minas frescal,

representadas por infecções em outros animais. Conforme descrito por Koneman (2001), o *S. intermedius* é o estafilococo coagulase positivo predominante isolado da pele canina infectada e normal. Esse microrganismo já foi detectado em feridas humanas provocadas por mordeduras de cães. O mesmo autor descreve que o *S. epidermidis*, é um SCO- encontrado em humanos e outros primatas. Trata-se de uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares, através de cateteres e sondas (material plástico). A espécie não produz toxinas e as infecções causadas por esta espécie são geralmente de origem hospitalar.

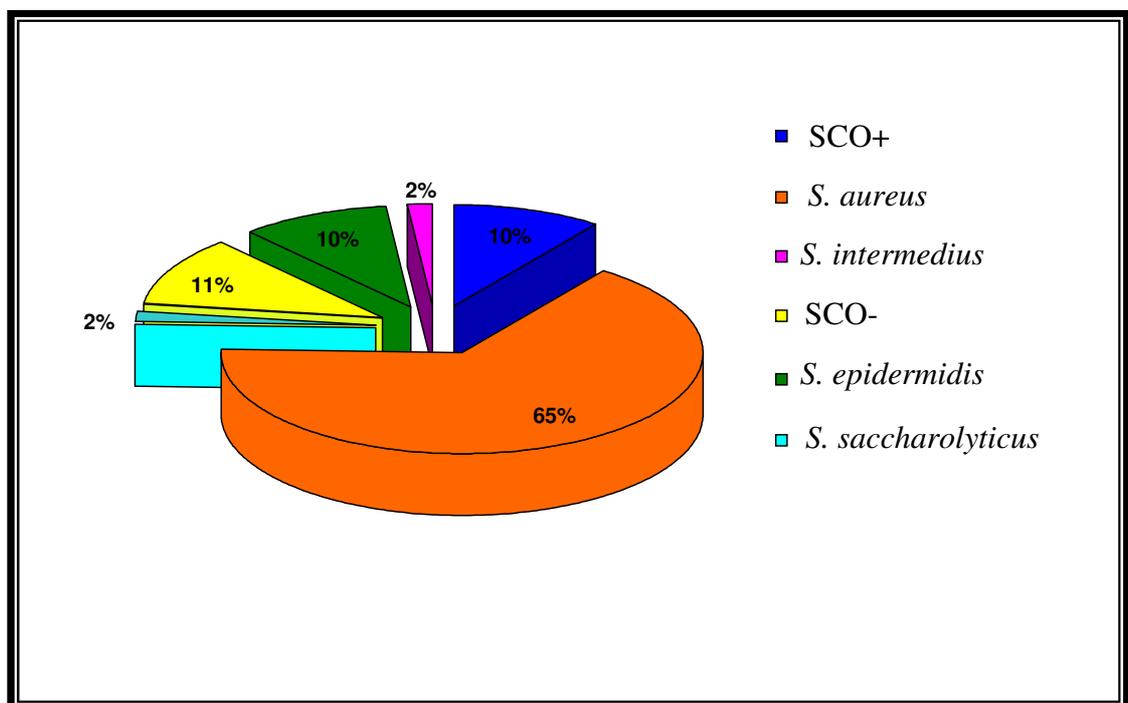


Gráfico 1. Frequência de *Staphylococcus* sp. isolados em amostras de queijo nas propriedades analisadas.

Das amostras de queijo Minas frescal analisadas todas apresentaram uma elevada contaminação por *Staphylococcus* sp., como representado na tab. 6.

Tabela 6. Contagem de *Staphylococcus* sp. em amostras de queijo Minas frescal nas propriedades “A” e “B”.

Propriedade	Queijos	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g)
A	1	$3,7 \times 10^7$
	2	$4,4 \times 10^7$
	3	$8,5 \times 10^7$
B	1	$4,7 \times 10^7$
	2	$5,4 \times 10^7$
	3	$1,7 \times 10^7$

A contaminação de amostras de queijo Minas frescal por *Staphylococcus* sp. observada neste estudo é semelhante aos resultados encontrados por Sena (2000) em Recife-PE, onde 98 % das amostras de queijo coalho analisadas apresentaram positividade para o mesmo microrganismo. Loguercio e Aleixo (2001) em Cuiabá-MT, ao analisarem 30 amostras de queijo Minas frescal, 29 (96,7 %) apresentaram contagem superior ao padrão legal aceitável para a legislação vigente ( $5 \times 10^2$  UFC/g). Esta elevada contaminação pode estar relacionada com a matéria prima deficiente ou associada a manipulação em condições higienico-sanitárias insatisfatória.

Assumpção et al. (2003), analisando queijo prato proveniente de um laticínio situado em Lavras-MG, observaram em três das cinco coletas realizadas, contagens de SCO+ variando entre  $1,0 \times 10^4$  e  $2,3 \times 10^5$  UFC/g, e de *S. aureus* entre  $1,0 \times 10^4$  e  $3,3 \times 10^4$  UFC/g. André et al. (2006), observaram que das 24 amostras analisadas de queijo Minas frescal provenientes do laticínio de Goiás, 17 (70,8 %) apresentaram contaminações por *S. aureus*. Sendo que a média da concentração celular foi de  $3,8 \times 10^4$ . Estudos realizados por Santos et al. (1995), avaliando a qualidade de queijos coalho comercializados em Fortaleza-CE, demonstraram que 62,5 % das amostras, estavam contaminadas com este microrganismo.

No presente estudo, a contagem de *S.aureus* do queijo proveniente da propriedade “A” variou de  $1,3 \times 10^7$  a  $8,5 \times 10^7$  e na propriedade “B” esta variação foi de  $1,7 \times 10^5$  a  $3 \times 10^8$  conforme descrito na tabela 7.

Tabela 7. Enumeração das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo Minas frescal produzidos nas propriedades “A” e “B”.

<b>Espécies</b>	<b>1ª coleta UFC/mL</b>	<b>2ª coleta UFC/mL</b>	<b>3ª coleta UFC/mL</b>
<b>Propriedade A</b>			
<i>S. aureus</i>	1,3x10 <sup>7</sup>	2,8x10 <sup>7</sup>	8,5x10 <sup>7</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1,3x10 <sup>7</sup>	—	—
<i>S. intermedius</i>	3,2x10 <sup>6</sup>	—	—
<b>Propriedade B</b>			
<i>S. aureus</i>	3x10 <sup>8</sup>	4,9x10 <sup>7</sup>	1,7x10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	—	5,4x10 <sup>6</sup>	—

Loguercio e Aleixo (2001), observaram uma contagem de *S. aureus* variando de  $1,0 \times 10^3$  a  $6,0 \times 10^4$  nos queijos Minas frescal analisados em Cuiabá-MT Sabioni et al. (1988), descreve um surto envolvendo queijo Minas frescal ocorrido em Ouro Preto MG, onde a contagem de *S. aureus* foi de  $9,3 \times 10^7$ . Salotti et al. (2006) avaliaram 60 amostras de queijo Minas frescal de Jaboticabal-SP, sendo 30 amostras de origem artesanal e o restante de produção industrial fiscalizada pelo Serviço de Inspeção Estadual e Federal, 20 % das amostras artesanais mostraram a contagem superior a  $5,0 \times 10^3$  e das amostras inspecionadas 10 % apresentaram contaminação variando entre  $5,0 \times 10^2$  a  $5,0 \times 10^4$ . Leite et al. (2005), pesquisaram a ocorrência de *S. aureus* em 20 amostras de queijo tipo Minas frescal, comercializadas em Cuiabá-MT, sendo que 5 eram de fabricação artesanal e 15 industrializadas. Das 5 amostras de queijo artesanal analisadas pelos autores, 80 % estavam contaminadas com SCO+ e nas demais amostras de queijo industrializado, observaram que 86,7 % eram positivas. A presença de populações de *S. aureus* acima de  $10^5$  UFC/g de alimento indica o risco potencial da presença de enterotoxina suficiente para causar intoxicação alimentar (Carmo e Bergdoll, 1990). As amostras de queijo Minas frescal analisadas no presente estudo apresentaram contagens de

*S. aureus* acima de  $10^5$  UFC/g, acredita-se que tais achados sejam extremamente importante pelo fato destes valores estarem muito próximo dos requeridos ( $10^5$  UFC/g a  $10^9$  UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para produção de enterotoxins em quantidades suficientes e necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (ALMEIDA FILHO e FILHO, 2000).

A alta frequência de *Staphylococcus* sp. observada nos queijos analisados pode ser explicada pela utilização de leite cru numa fabricação artesanal, com falhas em pontos críticos do processo de produção. Mesmo que os queijos provenientes da propriedade “B” fossem produzidos a partir do leite pasteurizado, elevada contaminação de *Staphylococcus* sp. observada pode ter ocorrido devido a uma manipulação sob condições higiênicas inadequadas ou até mesmo por uma contaminação ambiental, uma vez que estes microrganismos também estão presentes no ambiente.

Segundo Neto et al. (2002), todos os SCO+, são possíveis produtores de enterotoxinas. Sendo assim, a presença destes microrganismos em todos os manipuladores e ordenhadores assim como no leite utilizado na produção do queijo, indica um eminente risco de se veicular cepas enterotoxigênicas, podendo ocasionar uma intoxicação alimentar na população consumidora.

Em relação ao acompanhamento do processo de fabricação dos queijos Minas frescal analisados no presente estudo pode-se observar que os mesmos não eram realizadas de acordo com as Boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos. Na propriedade “A” onde o queijo foi elaborado a partir do leite *in natura* como citado anteriormente pode-se observar que não foram tomados os devidos cuidados ao manipular o leite e fabricar os derivados do leite. O processo de fabricação do queijo realizado na propriedade “A” está esquematizado na figura 17.

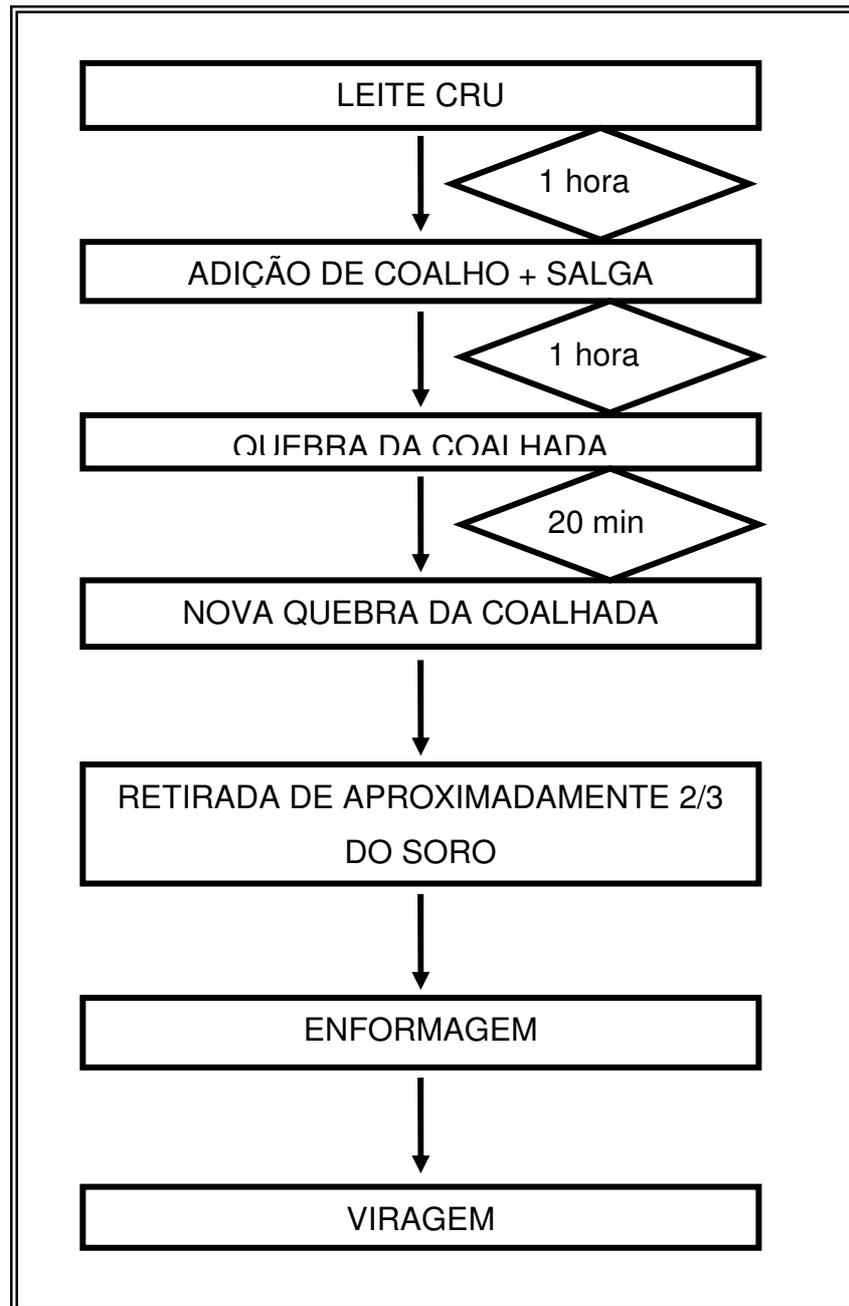


Figura 17. Processo de fabricação do queijo Minas frescal produzido na propriedade “A”.

Na propriedade “B” a fabricação do queijo Minas frescal foi realizada com leite pasteurizado através de uma pasteurização artesanal lenta como descrito anteriormente, foram tomadas alguns cuidados quanto a sua manipulação, mas não foram suficientes para que se evitasse uma recontaminação por microrganismos do gênero *Staphylococcus*. O processo de fabricação do queijo Minas frescal da propriedade “B” está descrito na figura 18.

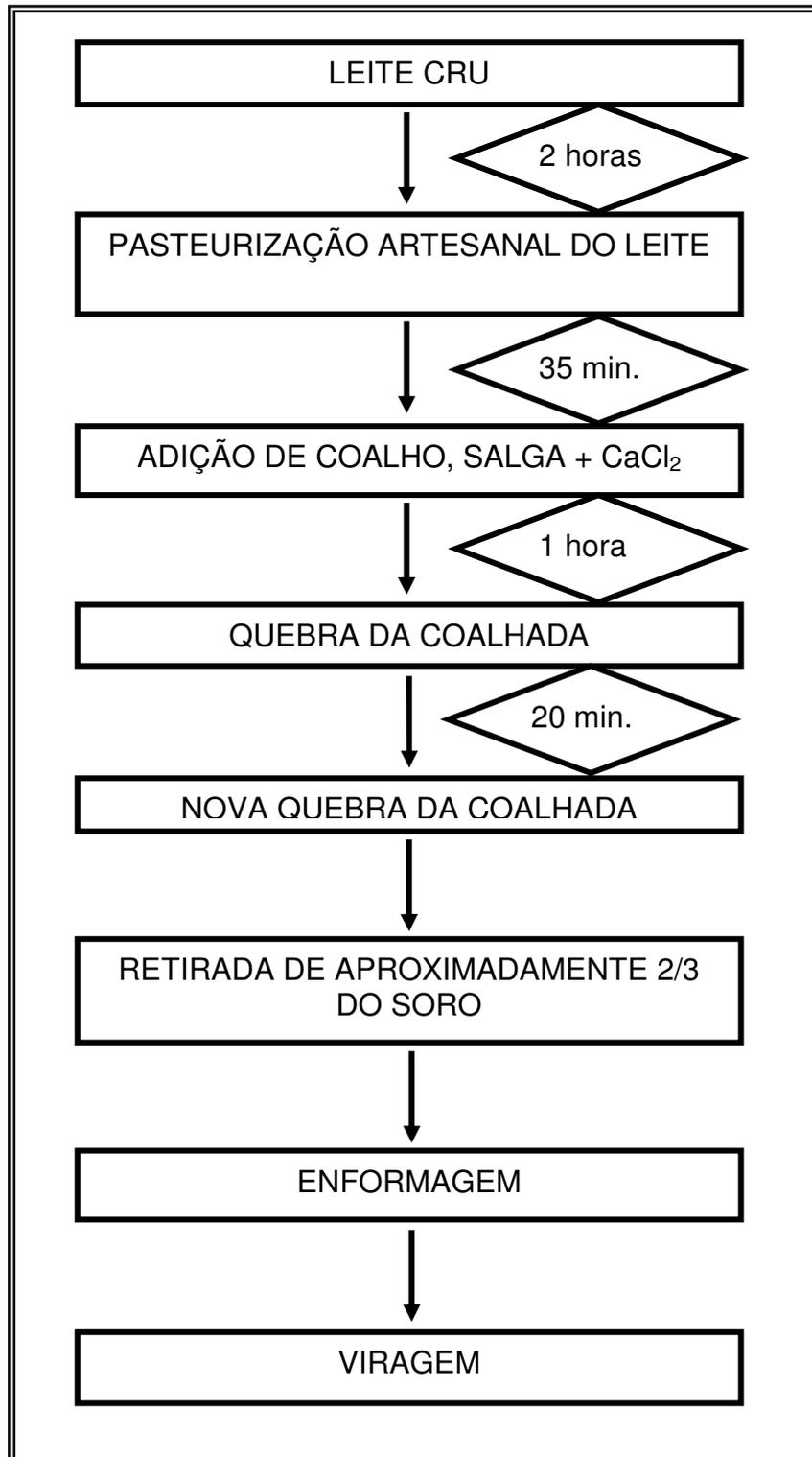


Figura 18. Processo de fabricação do queijo Minas frescal produzido na propriedade “B”.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ENTEROTOXINAS E DA TOXINA DA SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO NAS AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Em relação à detecção de enterotoxinas, observou-se que todas as amostras de queijo foram positivas para a enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) pelo método de OSP, não havendo positividade para as outras enterotoxinas e também para a toxina TSST-1. Pela metodologia ELFA não foram detectadas enterotoxinas (tab.8).

Tabela 8. Detecção de enterotoxinas pelos métodos OSP e ELFA a partir do queijo Minas frescal produzido nas propriedades “A” e “B”.

Propriedade	Queijos	Enterotoxinas Método OSP	TSST-1 Método OSP	Enterotoxinas Método ELFA
<b>A</b>	1	A	ND	ND
	2	A	ND	ND
	3	A	ND	ND
<b>B</b>	1	A	ND	ND
	2	A	ND	ND
	3	A	ND	ND

ND - Não detectado

Na literatura existem vários relatos em relação ao potencial de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* sp. em leite e derivados. Sabioni et al. (1988), revelaram a presença de enterotoxinas do tipo A, B, D e E em queijos Minas frescal contaminados por *S. aureus* envolvidos no surto de intoxicação, onde verificou-se que 80 % das cepas eram produtoras de enterotoxinas do tipo A. Neste trabalho foi detectada somente a enterotoxina do tipo A (SEA) em todas as amostras analisadas.

Carmo et al. (1994) verificaram a presença de SEA, SEB e SEC em amostras de queijo branco associadas com surto de intoxicação alimentar em Minas Gerais, trabalhando com o método OSP. Gomes e Gallo (1995) isolaram *S. aureus* de queijo Minas frescal comercializado em Piracicaba, SP. Entretanto, nenhuma das 23 linhagens foi produtora de enterotoxina, empregando-se o método OSP, diferindo,

portanto dos nossos resultados quando foi observada produção de SEA por este método revelando assim risco potencial pelo consumo desse produto.

Carmo et al. (2002), estudando dois casos de intoxicação alimentar por leite cru e queijo Minas frescal em Minas Gerais, detectaram pela metodologia de OSP enterotoxinas do tipo A, B, C nos queijos analisados e SE do tipo A e B no leite cru.

A detecção de SEA, observada neste estudo, confirma os relatos de Carmo e Bergdoll (1990) que descreveram esta enterotoxina como a mais freqüentemente encontrada em derivados do leite e estando associada a surtos de toxinfecção alimentar.

Das amostras de queijo Minas frescal testados, todas foram negativas para a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), conforme indicado anteriormente na tabela 8. Estes resultados são inferiores àqueles obtidos por Cardoso (2000), que analisando amostras de leite cru proveniente de vários municípios do Estado de Minas Gerais, observou que das 127 cepas de *S. aureus* isoladas, 83 (65 %) apresentaram produção de pelo menos um tipo de toxina, isolada ou em combinação, revelando alto grau de toxigenicidade. A TSST-1 foi a toxina mais produzida entre as amostras estudadas com 60 (47 %) das amostras positivas. Takeuchi et al. (1998), testaram 272 cepas de *S. aureus*, e detectaram altas porcentagens de produtores de TSST-1 em 76,7 % dos isolados de mastite subclínica, 58,1 % de mastite clínica e 75,4 % isolados de leite estocado em tanques de expansão. Entretanto, esses resultados são inferiores aos obtidos por Lamaita et al. (2005) que, ao analisarem leite cru, testaram 138 pools de *Staphylococcus* sp., para a produção de enterotoxinas e de TSST-1. 91 destes produziram pelo menos uma toxina isoladamente ou em associação a outras toxinas. 8 pools foram produtores da TSST-1.

Na literatura consultada, não foram encontrados registros de TSST-1 produzidas por cepas isoladas em queijos. Esse fato pode ser explicado pela ausência de casos de intoxicação alimentar envolvendo a toxina ou qualquer outro distúrbio orgânico causado por ingestão oral da mesma. Porém são necessários estudos mais criteriosos em relação a presença desse metabólito em queijos uma vez que a literatura mostra uma alta freqüência desta toxina em leites proveniente de vacas com mastite clínica e subclínica através da metodologia de OSP. Apesar de ainda não haver trabalhos associando a ocorrência da síndrome do choque tóxico

com o consumo de alimentos, seria importante investigar a possibilidade de transmissão desta síndrome via queijos frescal.

Em nenhuma amostra de queijo Minas frescal foi detectada a presença das enterotoxinas estafilocócicas pelo método de ELFA (tab. 8). As médias dos valores de fluorescência observados foram inferiores àqueles observados para a amostra utilizada como controle negativo.

Cunha Neto et al. (2002) em Pernambuco, observaram que todas as 06 cepas de *Staphylococcus* isoladas, submetidas ao teste de produção de enterotoxinas foram positivas, por apresentarem VT (valor do teste) acima de 0,13, caracterizando-as como cepas enterotoxigênicas. Da mesma forma, 100 % das cepas isoladas do queijo coalho foram positivas para enterotoxinas estafilocócicas, o que é comum segundo este autor, pois as características dos queijos frescos favorecem a multiplicação dos estafilococos e a produção de enterotoxinas.

Stamford et al. (2006), submeteram 43 cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite *in natura* ao teste para detecção de enterotoxinas. Em 33 (77 %) foram consideradas positivas e 22 destas foram identificadas como *S. aureus*.

A não detecção de enterotoxinas no queijo Minas frescal pelo método ELFA, pode ser explicado pela concentração elevada de fosfatase alcalina presente no alimento, já que esta enzima é encontrada normalmente no leite cru.

Pelo fato do conjugado anti-enterotoxina ser marcado com fosfatase alcalina concentrações elevadas desta substância no alimento podem interferir no resultado (BIOMERIEUX, 2004).

No entanto, observamos que além da pasteurização do leite outros métodos de controle de microrganismos devem receber igual atenção para se evitar a contaminação do queijo em etapas posteriores ao tratamento térmico.

Este estudo permitiu a observação de que a pasteurização do leite por si, não é suficiente para eliminar ou reduzir as contagens de *Staphylococcus* sp. no queijo, uma vez que foram observados no produto final das duas propriedades contagens de SCO+ superiores ao permitido pelo Ministério da Saúde (RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001) que é de  $5 \times 10^2$ , para o queijo Minas frescal.

#### 4.5 PERFIL DE RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

Nos testes de susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos, verificou-se que todas as amostras foram sensíveis a: gentamicina (100 %), tetraciclina e cefoxitina (96 %) e ao Trimetropim - sulfametoxazol (91 %), sendo que para a vancomicina, cefalotina, rifampicina, clindamicina e oxacilina a sensibilidade variou em torno de 70 %. As cepas isoladas tiveram uma maior resistência a: eritromicina (64 %), seguida da penicilina (36 %) e da ampicilina (32 %), conforme demonstrado no gráfico 2 e tab. 9.

André et al. (2006), em trabalho semelhante, observaram que dos 77 isolados analisados, todos foram sensíveis a ciprofloxacina e a gentamicina. Acco et al. (2003), estudando cepas isoladas das mucosas nasais e das mãos de manipuladores de alimentos verificaram que todos os isolados foram sensíveis a vancomicina, cefalotina, rifampicina, oxacilina, gentamicina, cloranfenicol e ofloxacina. Lange et al. (1996) testaram 100 cepas de *S. aureus* isoladas de inflamações intra-mamária e constataram uma sensibilidade de 100 % em relação a gentamicina, assim como Sena (2000), que também constatou uma sensibilidade de 100% à gentamicina. Estes resultados são semelhantes ao observado neste trabalho conforme ilustrado no gráfico 2. Esta alta sensibilidade a este antimicrobiano pode estar relacionado ao fato deste antibiótico ser pouco utilizado para tratamentos em mastites bovinas devido ao seu alto custo quando comparado à penicilina. Desse modo como o microrganismo não é exposto com frequência ao antibiótico, o mesmo tende a apresentar uma maior sensibilidade (SENA, 2000). O aminoglicosídeo gentamicina, demonstrou, ser o antibiótico de maior efetividade a *S. aureus* isolados no estudo. Entretanto, deve-se ressaltar que, embora este produto tenha apresentado maior efetividade, o uso indiscriminado na terapia da mastite ou outras infecções, pode levar a seleção de cepas resistentes, comprometendo a eficácia dos tratamentos.

Em relação aos antibióticos macrolídeos, as cepas estudadas apresentaram uma resistência relativamente alta a eritromicina (64 %). Estes dados são contrários aos observados por Sena (2000), onde 5,5 % das cepas de *S. aureus* isolados de queijo coalho eram resistentes. Calvinho et al. (2002) observaram que apenas 2 % das cepas foram resistentes ao antibiótico em questão.

Calvinho et al. (2002), em trabalho realizado em fazendas da Argentina isolaram 101 cepas de SCO+ e analisaram o perfil destas diante a ação de antimicrobianos. Detectaram que 47 % destas cepas foram resistentes a penicilina e a ampicilina, resultado semelhante ao observado neste estudo, onde as cepas analisadas, apresentaram 36 % de resistência a penicilina e 32 % a ampiciliana. Sena (2000) detectou uma resistência total por cepas de *Staphylococcus* sp. á ampicilina.

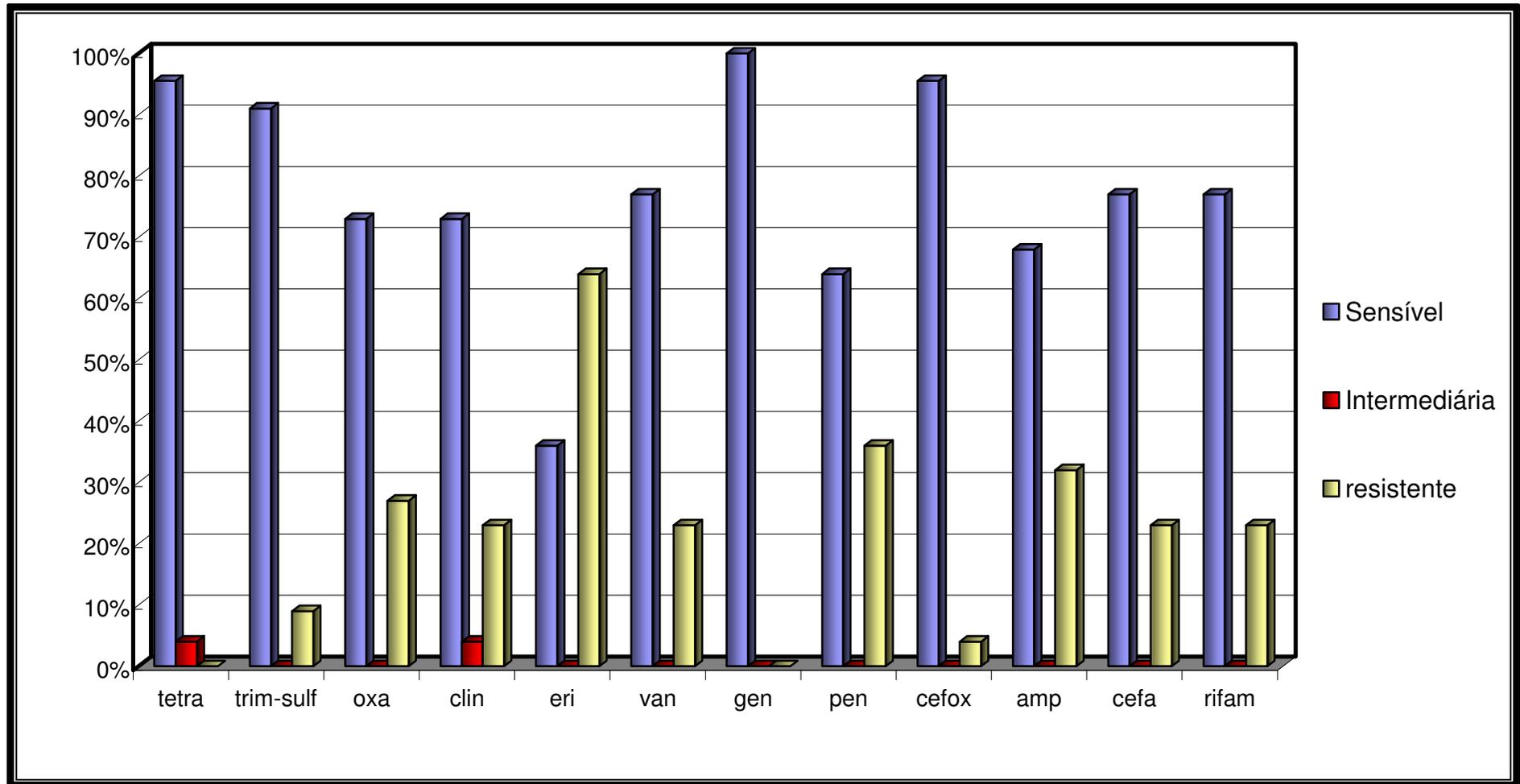


Gráfico 2. Percentagem de cepas de *S. aureus* isolados da linha de produção do queijo Minas frescal produzidos pelas propriedades “A” e “B”, diante do perfil de resistência aos antibióticos (tetra = Tetraciclina, trim-sulf = Trimetropim – sulfametoxazol, oxa = Oxacilina, clin = Clindamicina, eri = Eritromicina, van = Vancomicina, gen = Gentamicina, pen = Penicilina, cefox = Cefoxitina, amp = Ampicilina, cefa = Cefalotina, rifam = Rifampicina).

Tabela 9. Pool das cepas de *S.aureus* isolados do leite, ordenhadores, manipuladores, e do queijo das propriedades “A” e “B” e o perfil de resistência a doze antibióticos.

Sítio de coleta		Antibióticos											
		tetra	Trim-sulf	oxa	clin	eri	van	gen	pen	cefox	amp	cefa	rifam
<b>Propriedade A</b>													
<b>Leite</b>	(1ª coleta)	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
	(2ª coleta)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	(3ª coleta)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>Ordenhador 1</b>													
Fossas Nasais		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Mãos após ordenha		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>Ordenhador 2</b>													
Fossas Nasais		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Mãos após ordenha		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>Manipulador</b>													
Fossas Nasais		S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Mãos após assepsia		S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>Queijo</b>	(1ª coleta)	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	(2ª coleta)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	(3ª coleta)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<b>Propriedade B</b>													
<b>Leite</b>	(1ª coleta)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	(2ª coleta)	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	(3ª coleta)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Ordenhador</b>													
Fossas Nasais		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Mãos após ordenha		S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
<b>Manipulador</b>													
Fossas Nasais		S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
Mãos após assepsia		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Queijo</b>	(1ª coleta)	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	(2ª coleta)	I	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
	(3ª coleta)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R = resistente S= sensível I= intermediário

Calvinho et al. (2002), observaram que várias cepas foram sensíveis a oxacilina, resultado semelhante ao obtido neste estudo, pois 73 % das cepas isoladas apresentaram também este perfil. Tondo et al. (2000), em Porto Alegre, RS verificaram que em 94 % das amostras obtidas dos manipuladores, 47 % de leite cru e 50 % do produto final foram resistentes a penicilina. Acco et al. (2003), observaram que das cepas isoladas de manipuladores 70 % eram resistentes a penicilina. André et al. (2006), detectaram que a penicilina foi o antibiótico com menor eficiência contra *S. aureus*. A resistência das bactérias isoladas a partir dos manipuladores foi de aproximadamente 74 %, 69 % para as provenientes do leite cru e 68 % entre os obtidos a partir do queijo Minas frescal. Sena (2000) observou em seu trabalho que a maior resistência observada para as cepas de *S.aureus* isoladas foi para a penicilina (87 %). A alta resistência a penicilina pode ser explicada pela capacidade do *S. aureus* produzir beta-lactamase e pela possibilidade dos plasmídeos carregarem determinantes genéticos de resistência a drogas a outras espécies de *Staphylococcus*. Este fato é importante porque estas espécies podem permanentemente alterar o perfil de sensibilidade a drogas usualmente empregadas no combate a infecções humanas e animais (SENA, 2000). Provavelmente a variabilidade da resistência observada está relacionada a fatores geográficos e de manejo dos rebanhos.

#### 4.6 ELABORAÇÃO DA CARTILHA CONTENDO BOAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO E FABRICAÇÃO DOS DERIVADOS DO LEITE

O material foi elaborado com enfoque em tópicos básicos de segurança alimentar e de acordo com as não-conformidades observadas durante as coletas e acompanhamento da manipulação do queijo. Durante a elaboração, a linguagem e algumas informações técnicas foram ajustadas, visando proporcionar ao produtor uma leitura fácil e mais próxima de sua realidade.

O material didático (cartilha) encontra-se em anexo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação dos queijos Minas frescal analisados por *Staphylococcus* sp. pode ser explicada pelo fato das principais fontes de contaminação do queijo estarem no leite cru e ou via manipulação inadequada por pessoas portadoras destes microrganismos.

Este trabalho evidenciou uma elevada contaminação por *S.aureus* no leite destinado à fabricação de queijos, em ordenhadores, manipuladores e no próprio produto final.

Foi detectada a presença SEA em todas as amostras de queijo analisadas o que pressupõe um grave risco a saúde dos consumidores, já que esta enterotoxina é a mais comumente encontrada em gastroenterite estafilocócica.

Foi observada uma diferença importante na detecção de enterotoxinas entre os métodos OSP e ELFA. O extrato utilizado foi o mesmo para as duas metodologias. No entanto apenas no método OSP foi detectado a SEA. Nenhuma enterotoxina foi detectada através da metodologia ELFA. Isto provavelmente ocorreu devido a presença de substâncias do queijo (fosfatase alcalina) que podem ter prejudicado a eficiência da técnica.

Na propriedade “B”, apesar do queijo ser produzido a partir de leite submetido a uma pasteurização artesanal lenta, pode-se observar que a contaminação ocorreu novamente após este processo, durante a sua produção, atingindo concentrações semelhantes de *Staphylococcus* sp. ao da propriedade que usava o leite *in natura* para a fabricação de queijos. Provavelmente a alta contagem de *Staphylococcus* sp. observada no queijo proveniente do leite pasteurizado deve-se ao fato deste microrganismo ser deficiente em situações de competição com outros microrganismos. Com isto, o queijo fabricado com leite cru, por possivelmente apresentar outras espécies de microrganismos conseguiu, mesmo que parcialmente, conter o aumento de *S. aureus*. Já o queijo fabricado com leite pasteurizado recontaminado pode ter havido favorecimento ao crescimento desta espécie pela de eliminação de microrganismos antagonistas.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que os *S. aureus* isolados durante a linha de produção do queijo Minas frescal, das propriedades rurais analisadas, apresentaram uma alta resistência aos antibióticos comumente utilizados no tratamento de doenças animais, e de humanos, sendo

maior à eritromicina, seguida da penicilina e ampicilina e uma menor resistência aos antibióticos, gentamicina seguida da tetraciclina. Portanto, as observações de resistência enfatizam a necessidade de um uso prudente e crítico dos mesmos, buscando a prevenção da emergência e da disseminação de microrganismos resistentes.

Todos os queijos analisados foram considerados impróprios para o consumo humano de acordo com a legislação vigente, desta forma evidenciando-se a importância de se realizar um rigoroso controle de qualidade em todas as etapas de produção do queijo Minas frescal.

Em relação a cartilha, os produtores do queijo demonstraram interesse em melhorar, aperfeiçoar as técnicas de manipulação e em participar de cursos educacionais com o objetivo de aprimorar suas condições de trabalho, a fim de poderem oferecer aos consumidores alimentos de qualidade. O material educativo elaborado nesta pesquisa foi bem aceito por eles. Finalmente, conclui-se que a educação em segurança alimentar é a base para a produção de alimentos livres de contaminações.

É importante a consideração desses resultados pelos órgãos oficiais de inspeção e de vigilância sanitária no sentido de rever a atual legislação vigente no Brasil, em relação a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, da forma como é hoje determinado. Melhor seria, ainda, enfatizar a identificação de enterotoxinas nos alimentos, para garantir a real segurança destes ao consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUE, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiol** v.20, p. 489-493. 2003.
- ALMEIDA FILHO E. S.; NADER FILHO A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **Rev Saúde Pública** v.34, n.6, p. 578-80. 2000.
- ANDRÉ, M. C. D. P. F.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H. BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. Utilização do Antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo Minas frescal em laticínio de Goiás, Brasil. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, supl., p.102-108. 2006.
- ARAÚJO, W.P. **Staphylococcus aureus em leite cru. Produção de enterotoxina, caracterização da origem provável, humana ou bovina, à partir das cepas isoladas.** 1984. 127p. Tese (Livre Docência), São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 1984.
- ARAUJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ M. L.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Appl. Microbiol**, v. 92, p.1172-1177. 2002.
- ASSUMPÇÃO, E. G.; PICOLLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** [online]. v. 55, n.3, 2003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352003000300019&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352003000300019&script=sci_arttext) Acesso em: 14 dezembro de 2007.
- BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **J. Appl. Bacteriol. Symp.** Suppl. 19, v.70, n.1, p.1-8. 1990.
- BALABAN N, RASOOLY A. Staphylococcal enterotoxins. **Int J Food Microbiol.** v.61, p. 1-10. 2000.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne Bacterial Pathogens.** New York: Marcel Dekker, 1989, p.463-523.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.** v.10, p.91-100. 1990.
- BERGDOLL, M.S.; CHESNEY, P.J. **Toxic Shock Syndrome.** Boston: CRC Press,1991. 235 p.
- BETLEY, M.J., LOFDAHL, S., KREISWIRT, B.N. *et al.* Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. **Proceed. Nat. Acad. Sci.** n.81, p.51-79. 1984.

BIOMERIEUX S.A.. **PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DO KIT VIDAS®** Staph enterotoxin II. 2004.

BORELLI, B. M. **Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra – MG.** 2002. 109p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2002.

BRAMLEY ,A. J.; MAC-KINNO C.H. **Dairy microbiology: The microbiology of milk.** 2 ed. Londom/ New York. Elsevier Ltda, 163-207. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria 352 de 04 de setembro de 1997.** Dispõem o Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União, Brasília, Setembro de 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12 , de 02 de janeiro de 2001**, publicada no Diário Oficial da União de 30 de janeiro de 2001.

BRASIL. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (a). **Portaria 518 de 14 de junho de 2002.** Dispõem sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (b). **Instrução normativa nº. 51 de 18 de setembro de 2002.** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado. Anexo V, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde (c). **RDC 275 de 21 de outubro de 2002.** Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 22 de 14 de abril de 2003.** Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília: Ministério da Agricultura. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **RDC 216 de 15 de setembro de 2004** Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de alimentação. 2004.

CALVINHO, L. F.; TOSELLI, F. G.; WEIMANN, W. R.; CANVESIO, V. R.; NEDER, V. E.; IGUZQUIZA, I. A. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina Revista Argentina de Microbiologia, v. 34, n. 3, p. 171-175. 2002.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S. and SILVA, N. Detecção da Toxina-1 da Síndrome do Choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.52, n.1, p.07-10. 2000.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G.B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; AMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. . **Rev. Hig. Alim.**, v.16, p. 32-36. 2002.

CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Rev. Microbiol.** v.21, n.4, p.320-323. 1990.

CARMO, L.S., DIAS, R.S., ANUNCIACÃO, L.L.C., BERGDOLL, M.S.. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.47, n.2, p.113-122. 1994.

CARMO, L.S. **Manual para Elucidação de Surto de Toxinfecção Alimentar por Enterotoxina Estafilocócica. Laboratório de Enterotoxinas**, FUNED, Belo Horizonte, 24p. 1998.

CARMO, L. S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e toxina TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos. 2001. 250p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M. and HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and rawmilk in Brazil. **Food Microbiol.** v. 19. p. 9-14. 2002.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. An outbreak of Staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG,Brazil. **Int. J. Bras. archs. of biol. and Techn.** v. 46, n.4, p. 581-586. Dez. 2003.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Epi Info 2002. Division of public health surveillance and informatics. Disponível em <http://www.cdc.gov/epiinfo/downloads.htm>>. Acesso 28 dez. 2007.

CERQUEIRA, M.M.O.P., SOUZA, M.R., FONSECA, L.M. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas. **Arq. Bras. Vet. Zootec.** v.46, n.6, p.723–728. 1994.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2006. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100-S16. Clinical and Laboratory Standards. Institute, Wayne, PA. 2006.

CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. *Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos. **Seropopéia: Embrapa Agrobiologia**, (Embrapa-CNPAB. Documentos,114) 15p. Dez. 2000.

COSTA, S. R.; GABAN, C. R. G.; LEAL, C. R. B. Detecção de *Staphylococcus aureus* nas mãos e narinas de manipuladores de alimentos e avaliação higiênicas das cozinhas, em escolas estaduais no município de Campo Grande-MS. **Ensaio e Ciência**, v.6, n.2, p.49-56. 2002.

CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em revista**, Duque de Caxias, v.2, n.1, p. 105-114. 2007.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus enterotoxigênicos* em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271. Set-dez 2002.

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

DINGES M. M. , ORWIN P. M. , SCHILIEVERT P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev** v. 13 p.16-34. 2000.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS – EPAMIG 1989. **Os queijos na fazenda** 3 ed. São Paulo: Globo. 1989.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA 2005. **Brasil – produção, importação, exportação e consumo de leite**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 10/11/2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA 2006. **Produção mundial de queijo – (toneladas)**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 21/11/2007

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p. 1315-1320. 2004.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alimentos. **Rev. Hig. Alim.**, v.14, p. 70-77. 2000.

FRANCO, B.D.G.M. Critérios Microbiológicos para avaliação da qualidade de Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2004. cap.8, p. 149-154.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em alimentos. In FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2004. cap.4, p. 33-81.

FUEYO, J. M.; MARTINS, M. C. GONZALEZ-HEVIA, M.A. et.al. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol.**, v.67, p. 139-145. 2001.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED, INSTITUTO OCTAVIO MAGALHÃES – (IOM), DIVISÃO DE VIGILANCIA SANITÁRIA – DIVISA – Laboratório de Microbiologia de alimentos, POP nº.LMA-Met 0005/01 Isolamento e contagem de estafilococos coagulase positiva, 2003. 9 p.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED, INSTITUTO OCTAVIO MAGALHÃES – (IOM), DIVISÃO DE VIGILANCIA SANITÁRIA – DIVISA – Laboratório de Enterotoxinas, POP nº.LMA-Met LEA - Met 0009/01 Extração de enterotoxinas estafilocócicas a partir do alimento, 2007. 16 p.

FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991, 297p.

GÓES, J. A. W. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Rev. Hig. Alim.**, v. 15, p. 20-22. 2001.

GOMES, H.A.; GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção e enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Fresca” comercializado em Piracicaba-SP. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v.15, n.2, p.158-161. 1995.

GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. **Rev. Hig. Alim.**, v. 12, n. 53, p. 38-43. 1998

HAZELWOOD, D. e MCLEAN, A. C. **Manual de higiene para manipuladores de Alimentos**; tradução: CESCHIN, J. A. , São Paulo: Livraria Varela, 1994.

JABLONSKI L. M.; BOHACH G. A. *Staphylococcus aureus*. In DOYLE M. P.; BEUCHAT L. R.; MONTVILLE T. J. (eds) **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, 1997, p. 353-375

JONES, T. F.; KELLUM, M. E.; PORTER, S. S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect Dis** v.8, p. 82-84. 2002.

KHAMBATY, F.M.; BENNETT, R.W.; SHAH, D.B. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiol. Infect.** v. 113, n.1, p.75-81. 1994.

KLOOS, W.E. Systematics and natural history of Staphylococci. **J. Appl. Bacteriol. Symp.** Suppl. v.70, n.3, p.255-375. 1990.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465 p.

LANGE, C.C., CARDOSO, M.R.I., PIANTA, C. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, isolados de mamite bovina em Porto Alegre, RS, Brasil. Anais do XV CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996. Campo Grande. Anais..., 1996, p.180. 1996.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. Staphylococcus aureus and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P., ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association,. 4. ed, Washington, D.C., USA, 2001. chapter 39, p.387-403.

LAMAITA, H. C., CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de Staphylococcus sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da Síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, p. 702-709. 2005.

LE LOIR Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Gen Mol Res** v. 2, p.63-76. 2003.

LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo frescal. **Rev. Hig. Alim**, v. 19, p. 89-93. 2005.

LEITE, Z. T. C., VAITSMAN, D. S., DUTRA, P. B. Leite e alguns de seus derivados – Da antigüidade à atualidade. **Quim. Nova**, v.29, n.4, p.876-880. 2006

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios**. 2005. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo,. Piracicaba-São Paulo. 2005.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int. Antimicrob. Agents** v.16 Suppl 1, p. 3-10. 2000.

LOGUERCIO, A. P., ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Rev. Ciênc. Rural** – Santa Maria, v. 31, n. 6,p. 1063-1067. 2001.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus **J. Clin. Invest.** v.111, p.1265–1273. 2003.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2.ed. Baltimore Williams e Wilkins: 1980, p.527.

MACIEL, C. H. P.; PINHEIRO, M. S.; VILAS BOAS G. V. Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em manipuladores de alimentos de uma indústria de linguiça do estado do Rio de Janeiro. **XVIII Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Porto Alegre-RS. p. 3240, 2002.

MARTINS, A., CUNHA, M. L. R. S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects – Review. **Micrbiol. Immunol.**, v.51, nº 9, p. 787-795. 2007.

MESQUITA, A.J. Enumeração de *Staphylococcus* em leite cru. **An. Esc. Agron. Vet.** v.18, n.1, p.5-11. 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico – Vigilância epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 - 2004**. Disponível na Internet via: WWW:<<http://www.saude.gov.br/svs> Ano 5, nº 06, 28/12/2005. Acessado em novembro, 2007.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFLER, M.A. **Microbiologia médica**. 4ed. Washington D.C: *American Society For Microbiology*. 2004, p.188.

NASCIMENTO, M. G. F. N.; CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, E.R. **Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus***. Rio de Janeiro: EMBRAPA Agroindústria de alimentos, dez. 2001. 4p. EMBRAPA CTAA. Comunicado Técnico, 45.ISSN 0103-5231. 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Approved Standard M2-A7, 2002. **Performance standard for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**, vol. 15, n. 14, Approved Standard NCCLS, Villanova, Pa. 2002

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).[ON LINE] Disponível na Internet via WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. National Institutes of Health, Washington, DC. Acesso em Dezenbro, 2007.

NETO, A. C.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 22, n 3, p. 263-271. 2002.

NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIONI, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A. P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PIRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUAGLIA, N. C., CELANO, G. N. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 98, p. 73-79. 2005.

OLIVEIRA, A. M.; GONÇALVES, M. O.; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T. L. M. Manipuladores de alimentos. Um fator de risco. **Rev. Hig. Alim.**, v. 17 p. 12-19. 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Métodos de vigilância sanitária y de gestión para manipuladores de alimentos: Informe de una reunión de consulta de la OMS, Ginebra. 1989.** Disponível em: <http://www.who.int/whqlibdoc.who.int/>. Acesso em: 25/11/2007.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da serra da canastra – MG.** 2005. Dissertação (Tecnologia e Inspeção de produtos de origem animal). Instituto de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2005.

PEREIRA, M. L. LARA, M.A. DIAS, R. S., CARMO, L.S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo "Minas". **Rev. Microbiol.**, v. 22, n.4, p. 349-350. 1991.

PINTO, P. S. A., GERMANO, M. I. S., GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da vigilância sanitária. **Rev. Hig. Alim.**, v. 10, n. 44, p. 22-35. 1996.

PINTO, R. G.; ORNELAS, E. A., TOMICH, T. R.; PEREIRA, A. J. G. Avaliação da higienização das mãos dos manipuladores em uma indústria de pão de queijo. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu-PR. p. 416. 2001

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Syst. Apply. Microbiol.** v. 28, p. 340-352. 2005.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R., PENNA, C. F. A. M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.1, p.130-133. 2004

RODRIGUES, F. T., VIEIRA, M.D., SANTOS, J.L. Características microbiológicas de queijo tipo "Minas Frescal" comercializados em Viçosa, MG. **In: 8º Congresso Nacional de Laticínios**, Juiz de Fora, MG. Anais. Juiz de Fora, p.233-235. 1995.

ROOS, T. B.; FILHO, V. B. S.; TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. S. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos, RS. **Rev. Hig. Alim.**, v.19, p. 94-96. 2005.

SÁ, M. E. P. ; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; LANGONI, C. V. H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz. J. vet. Anim.Sci.** v.41, n.5, p.320-326. 2004.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde públ.** V.22, n5, p. 458 – 461. 1988.

- SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A.C. F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.73, n.2, p.171-175. 2006.
- SANTOS, E.C., GENIGEORGIS, C., FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian Minas cheese. **J. Food Protect.** v.44, n.3, p.172-176. 1981.
- SANTOS, E.C., GENIGEORGIS, C. Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. **J. Food Protect.** v.44, n.3, p.177-184. 1981
- SANTOS, F.A, NOGUEIRA, N.A.P., CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza, CE. **Bol. CEPPA** v.13, n.1, p.31-36. 1995.
- SCHWABE, M., NOTERMANS, S., BOOT, R., TATINI, S.R. AND KRÄMER, J. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. **Int. J. Food Microbiol.** v. 10, p. 33-42. 1990.
- SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência de antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* spp isolados de queijo coalho comercializados em Recife-PE.** 2000. Tese (Doutorado em Tecnologia de Carne, leite e derivados). Instituto de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de Análise microbiológica de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 229 p.. 2001.
- SILVA Jr., E. A. **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação.** 6a ed. Livraria Varela, São Paulo, 623p.. 2005.
- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre aquisição gradual de Resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev. Patol. Trop.** v. 34, n. 1, p. 27-36. 2005.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Cienc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.26, n. 1, p. 41-45. 2006.
- STEPHAN, R.; ANNEMUÈLLER, C.; HASSAN, A.A.; LAÈMMLER, CH. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veteryn. Microbiol.** v. 78, p. 373- 382. 2001.
- TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Vet. Microbiol.** v.59, n.54, p.251-258. 1998.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos**, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1996, 792p.

TEMELLI, S.; ANAR, S.; SEM, A; AKYUVA, P. Determination of microbiological contamination sources during Turkish white cheese production. **Int. J. of Food Microbiol., Food Control** V. 17, n. 11, , p. 856-861. 2005.

TONDO, E. C.; GUIMARÃES, M. C.; HENRIQUES, J. A.; AYUB, M. A. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Can J Microbiol** v.46, p. 1108-14. 2000.

TSEN, H.Y.; YU, G. K.; WANG, K. C., WANG, S. J.; CHANG, M. Y. e LIN, L.Y. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. **Food Microbiol.** v. 15, p. 33-41. 1998.

VAN ANSON, G. **Comércio de ambulantes de alimentos em Curitiba: Perfil de vendedores e propostas para programa de boas práticas higiênicas na manipulação de alimentos**. 2005, 84 f.. Dissertação (Mestre em Tecnologia de alimentos). Setor de tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

VAUTOR E, ABADIE J, GUIBERT M, HUARD C, PÉPIN M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Vet. Microbiol.** v. 96, p. 69-79. 2003.

VIEIRA, S. **Introdução a Bioestatística**. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1980.196 p.

XAVIER, C. A. C.; OPORTO, C. F. O.; SILVA, M. P.; SILVEIRA, I. A.; ABRANTES, M. R. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN. **RBAC**, v. 39, n.3, p.165-168. 2007.

YOSHIDA-JR, C.; KITAGAWA, A.; KAWANO, C.; HONDA, F.; SAMAAN, F. Antibióticos. Farmácia Médica, 2000. [ON LINE]. Disponível na Internet via WWW: <http://br.geocities.com/cyjr2000/atbhome.htm>. Acesso em: Dezembro 2007.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Fórmulas dos meios de cultura

#### **Ágar Baird - Parker (BP):**

Triptona:	10g
Extrato de carne:	5,0g
Extrato de levedura:	1,0g
Piruvato de sódio p.a:	10g
Glicina:	12g
Cloreto de lítio:	5,0g
Ágar:	20g
Água destilada:	950mL

Suspender os ingredientes na água destilada, ajustar a pH 6,8 e aquecer em banho-maria até a completa dissolução do ágar. Esterilizar a 121°C por 15 min, resfriar a 45° a 50°C. Após a esterilização, o pH final deve situar-se entre 6,8 e 7,0 e acrescentar a emulsão de gema de ovo 50%, enriquecido com 0,1% de telurito.

#### **Água Peptonada Tamponada (APT)**

Peptona de carne	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato monobásico de sódio	9,0 g
Fosfato monobásico de potássio	5,0 g
Água destilada/deionizada	1L

Suspender os ingredientes em 1L de água destilada, ajustar o pH para:  $7,2 \pm 0,2$ . Esterilizar a 121°C por 15 min.

**Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI):**

Cloreto de sódio	5,0g
Dextrose	2,0g
Fosfato bibásico de sódio	2,5g
Sólidos de infusão de cérebro de bezerro	12,5g
Sólidos de infusão de coração de boi	5,0g
Peptona de carne	5,0g
Peptona de caseína	5,0g
Água destilada	1L

Diluir 37g em 1L de água destilada. Aquecer ligeiramente, se necessário. Ajustar o pH: 7,4  $\pm$ 0,2.

**Plasma Liofilizado:**

Cada frasco contém um pool de plasma de coelho liofilizado, coletado com EDTA (este produto não é utilizado pelos estafilococos, sendo assim considerado inerte). O produto destina-se ao uso diagnóstico *in-vitro*. Para dissolvê-lo utiliza-se uma pipeta estéril, acrescentar a quantidade de solução de Salina 0,85% estéril indicada no rótulo, aguardar alguns minutos e depois homogeneizar suavemente até a completa dissolução do produto. Após aberto e diluído, o produto mantém estável por até 8 horas em geladeira (2-8°C).

**Ágar nutriente:**

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Ágar	15 g

Dissolver os componentes em 1L de água destilada e ajustar o para pH: 6,8. Distribuir 3 mL por tubo e autoclavar a 121° por 15 min. Após retirar da autoclave, inclinar os tubos ainda quentes para que solidifiquem com a superfície em forma de "bico de flauta".

**Ágar sangue:**

Ágar bacteriológico	15 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Peptona de carne	10,0 g
Peptona de caseína	5,0 g

Dissolver os componentes em 1L de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min. Esfriar a base à +/- 50°C. Adicionar 5 mL de sangue desfibrinado de carneiro para cada 100 mL de base, homogeneizar delicadamente para não formar bolhas e distribuir em placas de petri de 90 mm de diâmetro.

**Ágar FAM Manitol e Maltose:**

Proteose de Peptona	10,0g
Extrato de Carne	1,0g
Púrpura de Bromocresol	0,02g
Cloreto de Sódio	5,0g
Ágar bacteriológico	15g
Açúcar *	20,0g

OBSERVAÇÃO: \* Para Ágar Maltose adicionar uma solução de Maltose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) a 10%, e para Ágar Manitol adicionar uma solução de Manitol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) a 10%, ambos açúcares esterilizados por filtração, conforme abaixo:

Suspender os ingredientes em 1 litro de água destilada e aquecer até completa dissolução. Ajustar o pH para 6,8 +/- 0,2 e distribuir 80,0 mL por frasco. Autoclavar a 121°C por 15 min. Guardar o meio na geladeira. Quando houver utilização do meio, dissolver o ágar em banho-maria e deixar esfriar até 45°C +/- 50°C. Em seguida adicionar para cada 80,0 mL do meio fundido 20,0 mL da solução de açúcar esterilizado anteriormente por filtração. Distribuir o ágar em placas de petri.

### Caldo – TSB

Dissolver 37g em 1L de água destilada. Agitar até ficar completamente diluído. Autoclavar a 121 °C por 15 min.

### Ágar azul de O-toluidina – DNA

DNA:	0,06g
Cloreto de Cálcio anidro pa (CaCl <sub>2</sub> ):	1,1 mg ou 2 mL
Cloreto de Sódio pa (NaCl):	2,0g
Azul de O-toluidina (solução aquosa a 1%) (C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N):	0,0166g ou 2 mL
Tris (hidroximetil) aminometano C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ):	1,22g
Ágar bacteriológico:	2,0g
Água destilada qsp:	196mL.

Dissolver os ingredientes em um erlenmeyer, com capacidade para 250mL, contendo água destilada, exceto o azul de O-toluidina, e ajustar o pH 9,0. Aquecer até a ebulição para completa dissolução. Adicionar o azul de O-toluidina em temperatura ambiente. Caso a solução esteja ainda quente o azul de toluidina irá precipitar. Após esfriar, conservá-lo em geladeira a 4°C. A esterilização é desnecessária.

### Ágar Mueller Hinton

Extrato de carne	2g
Caseína	17,5 g
Amido	1,5g
Ágar	7g

Dissolver os componentes em 1L de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121 °c por 15 min.

**Ágar nobre (1,2 %)**

Disolver 1,2g de ágar Nobre em 100 mL de tampão PBS 0,02 M, pH 7,4. Diluir o ágar ao tampão aquecendo a solução. Após fervura, esperar esfriar sem solidificar e adicionar 1,0 mL de Timerosol 1:1000.

**Tampão Fosfato (PBS) 0,02mol/L, pH 7,4**

Preparo da solução ácida:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (fosfato monossódico 1-hidrato)

**Solução A**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2,76 g
NaCl	9,0 g

Completar para 1L de  $\text{H}_2\text{O}$ (dest.)

Preparo da solução base:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (fosfato dissódico)

**Solução B**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	11,36 g
NaCl	36 g

Completar para 4L de  $\text{H}_2\text{O}$ (dest.)

Verter o ácido na base até atingir pH = 7.4. .Autoclavar o tampão a 121 °C por 15 minutos. Manter a solução sob refrigeração.

**Solução de Timerosol ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgO}_2\text{SNa}$ ) a 0,001% (1:1000)**

Dissolver 1g de Timerosol em 1000 mL de água destilada para solução estoque (1:1000). Guardar em temperatura ambiente.

Anexo 2 – Interpretação do diâmetro da zona de inibição para os antibióticos utilizados

<b>Antibióticos</b>	<b>Diâmetro do halo (mm)</b>		
	<b>Resistente (R)</b>	<b>Intermediário (I)</b>	<b>Sensível (S)</b>
Ampicilina	≤ 28	—	≥ 29
Cefalotina	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Rifampicina	≤ 16	17 a 19	≥ 20
Clindamicina	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Vancomicina	-	—	≥ 15
Eritromicina	≤ 13	14 – 22	≥ 23
Gentamicina	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Cefoxitina	≤ 14	15 – 17	≥ 18
Oxacilina	≤ 10	11 – 12	≥ 13
Penicilina	≤ 28	—	≥ 29
Tetraciclina	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Trimetropim - sulfametoxazol	≤ 10	11 – 15	≥ 16

Fonte: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002 M100-S11 (M2).  
Disk Diffusion Eleventh Informational Supplement. NCCLS, Wayne Pa.

### Anexo 3 – Cartilha do Manipulador de derivados do leite

Esta cartilha foi elaborada através de dados obtidos durante a realização da dissertação de mestrado da pesquisadora Juliana Fonseca Moreira da Silva intitulada “**Detecção de *Staphylococcus* sp. no processo de produção do queijo Minas frescal comercializado em Palmas e caracterização do perfil de resistência frente a diferentes drogas antimicrobianas**” junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins de março de 2006 a fevereiro de 2008 em Palmas - TO.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**Programa de pós-graduação em Ciências do Ambiente**

**CARTILHA DO MANIPULADOR DE DERIVADOS DO LEITE**



**APRESENTAÇÃO**

Esse material didático foi elaborado com o intuito de colaborar no processo de conscientização dos manipuladores de derivados do leite. O objetivo é instruí-los sobre os procedimentos gerais relativos a Boas Práticas de produção durante a manipulação, e orientá-los sobre os riscos para a saúde dos consumidores caso ocorra a ingestão de alimentos em condições insatisfatórias para o consumo.

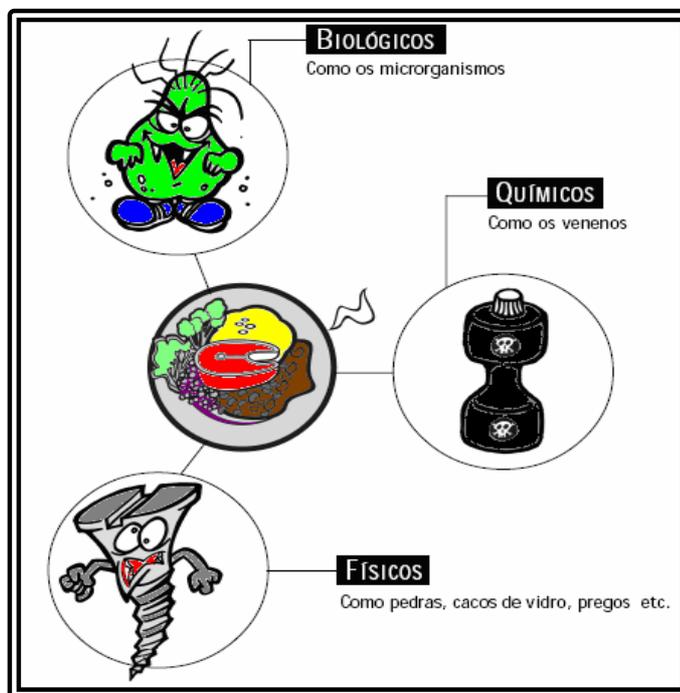
A produção de alimentos com segurança é a garantia de estar oferecendo alimentos de qualidade a seus clientes. Com isso todos lucram: o consumidor, por ter a certeza de estar comprando um produto de qualidade e os produtores que verão a cada dia o aumento do número de clientes satisfeitos com os alimentos por eles produzidos.

## ALIMENTOS SEGUROS

**DEFINIÇÃO:** Alimentos seguros são aqueles que não oferecem perigos à saúde e a integridade do consumidor, ou seja, alimentos livres de contaminações.

A contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer momento, do manuseio, da produção, do armazenamento e até mesmo na sua comercialização.

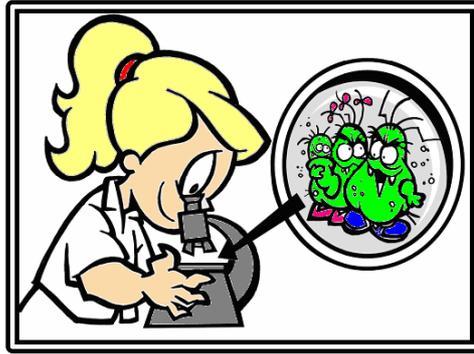
Existem várias situações de perigo relacionadas aos alimentos, tais como: **Perigos biológicos, Químicos, e Físicos.**



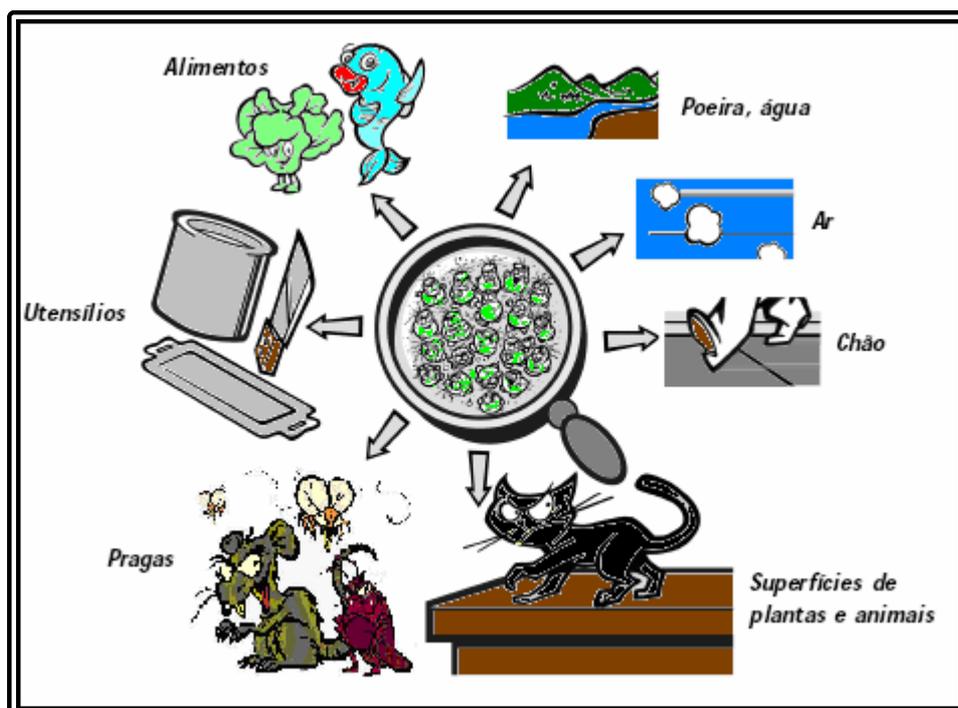
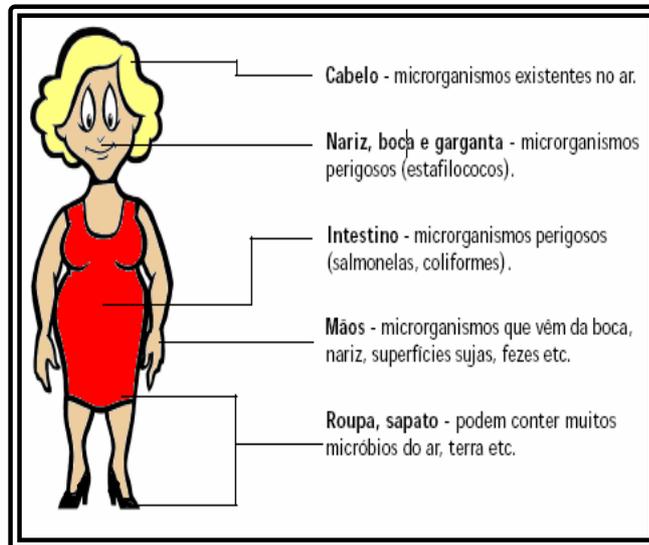
## QUALIDADE E HIGIENE NA MANIPULAÇÃO DE QUEIJOS

Para se ter uma boa qualidade na produção de queijos e derivados do leite é preciso que os manipuladores tomem alguns cuidados a fim de evitar a contaminação.

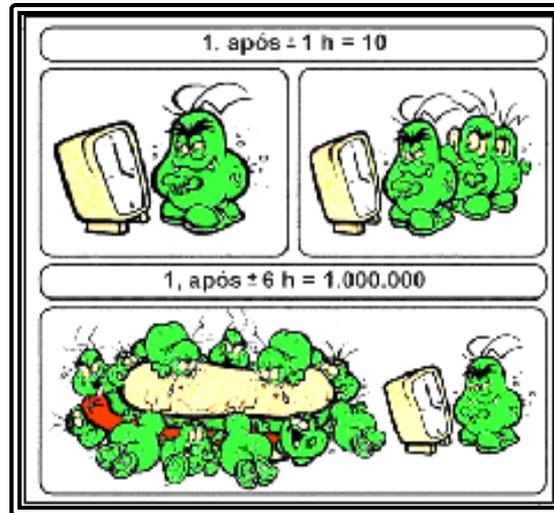
A principal fonte de contaminação são os microrganismos, que são seres vivos pequeninos também conhecidos como micróbios.



Eles estão por todo lado, em nossas mãos e corpo, no ar, nos utensílios de cozinha e mesmo nos alimentos que ingerimos.



Eles se multiplicam muito rápido, e podem ser introduzidos nos alimentos principalmente pelo manuseio de forma incorreta e sem higiene.



### **BOAS PRÁTICAS DE MANIPULAÇÃO**

Boas práticas são regras que quando praticadas evitam e reduzem os perigos biológicos, físicos e químicos.

Eis aqui algumas regras:

- Higiene em geral (corporal, pessoal, dos utensílios e equipamentos);
- Comportamento no ambiente de trabalho;
- Qualidade da matéria prima;
- Preparo armazenamento e transporte dos alimentos.

### **HIGIENE CORPORAL**

**Definição:** È o conjunto de práticas sadias que cada pessoa deve ter com o seu próprio corpo, para preservar a própria saúde e, a dos outros. A higiene corporal é fundamental para a proteção dos alimentos.

Para se ter uma boa higiene pessoal é preciso:



Tomar banho diariamente



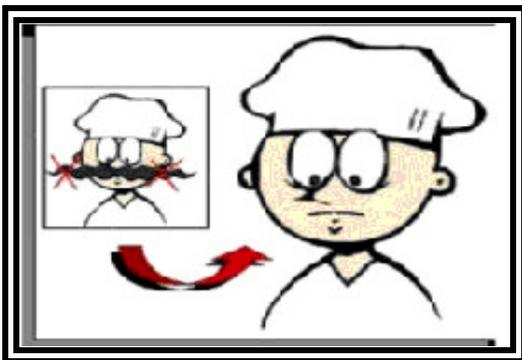
Enxugar-se em toalha limpa



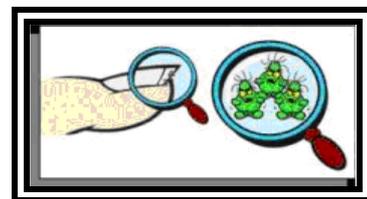
Escovar os dentes após as refeições



Manter-se barbeado

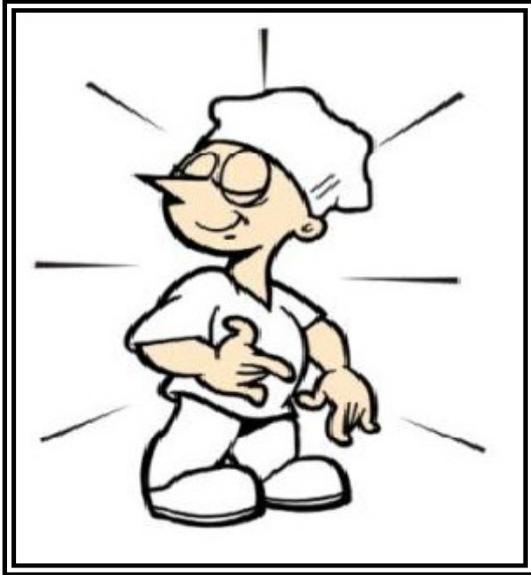


Manter cabelo e bigode aparados  
Melhor é não usar bigode

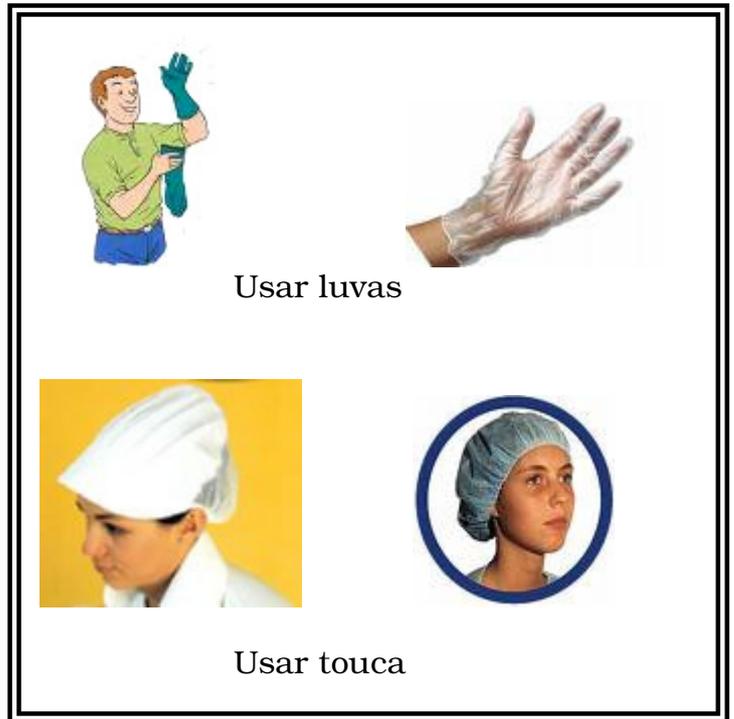


Manter as unhas curtas  
e limpas

## HIGIENE PESSOAL



Usar uniforme limpo e de cor clara



Usar luvas

Usar touca

## HIGIENE DAS MÃOS

Freqüência obrigatória para lavar as mãos

Lavar as mãos sempre que:

- Chegar ao trabalho;
- Manipular alimentos;
- Mudar de atividades;
- As mãos estiverem sujas.



Antes de:

- Iniciar um novo serviço;
- Tocar em utensílios higienizados;
- Colocar luvas.



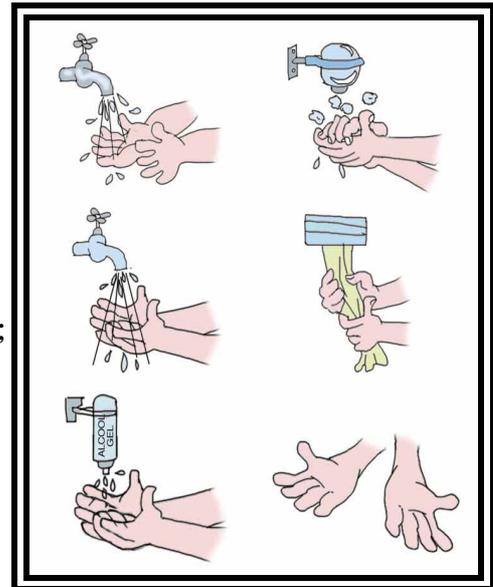
Depois de:

- Utilizar os sanitários;
- Tossir, espirrar ou assoar o nariz;

- Usar panos ou materiais de limpeza;
- Fumar ou pegar em dinheiro;
- Recolher ou tocar o lixo;
- Ou qualquer interrupção do serviço.

### PROCEDIMENTOS PARA HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS

1. Umedecer as mãos e antebraços;
2. Passar sabão ou detergente e esfregar por 15 a 20 seg.;
3. Lavar bem entre os dedos;
4. Lavar as unhas com escova apropriada;
5. Enxaguar e secar bem;
6. Passar desinfetante (álcool 70%);
7. Deixar secar naturalmente.

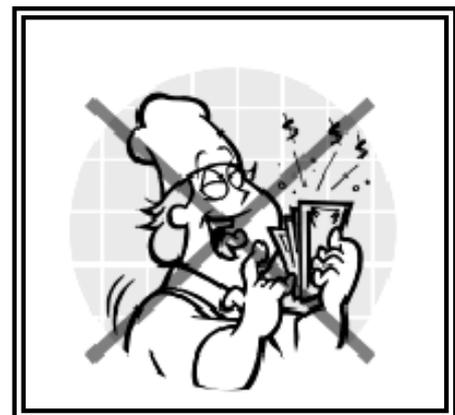
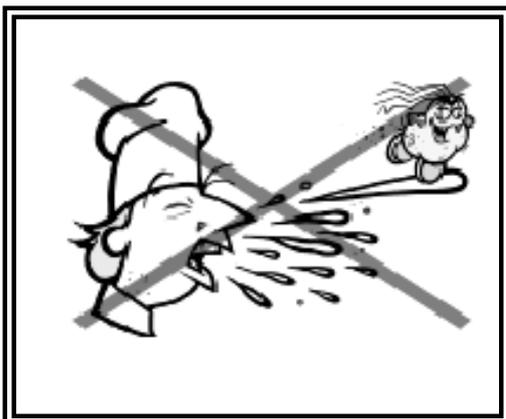


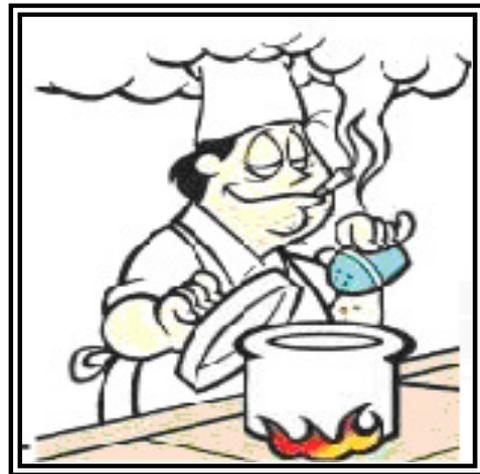
### LEMBRE-SE: LAVE SEMPRE AS MÃOS

#### COMPORTAMENTO NO AMBIENTE DE TRABALHO

Durante a manipulação dos alimentos devemos evitar alguns comportamentos no ambiente de trabalho, portanto esteja sempre atento para garantir um alimento de qualidade.

#### O que não se deve fazer:





## **HIGIENIZAÇÃO DOS UTENSÍLIOS E EQUIPAMENTOS DE TRABALHO**

Todos os equipamentos, utensílios e móveis que entram em contato com alimentos devem ser mantidos em condições higiênico-sanitárias apropriadas.

### **Definições:**

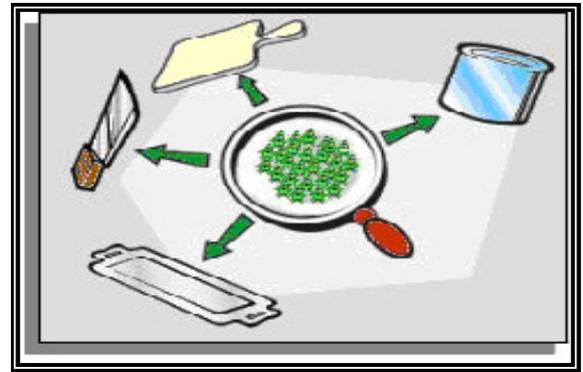
Higienização: Operação que compreende duas etapas, a limpeza e a desinfecção.

Limpeza: Operação de remoção de substâncias minerais ou orgânicas indesejáveis, tais como terra, poeira, gordura e outras sujidades.

Desinfecção: operação de redução, por métodos físicos e ou por agente químico, do número de microrganismos até níveis aceitáveis que não comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Todos os utensílios e equipamentos que entrem em contato com alimentos devem ser higienizados para evitar a contaminação. E serem guardados em local limpo e seco, devendo ficar protegidos de poeira, mosca, barata, formigas e outros animais.

A higienização dos utensílios e equipamentos deve ser feita por um profissional capacitado. Durante a higienização devem-se utilizar produtos que sejam regularizados pelo Ministério da Saúde, para garantir segurança e eficiência



### **HIGIENIZAÇÃO DO LOCAL DE TRABALHO**

O local de trabalho deverá ser mantido em condições higiênico-sanitárias apropriadas, portanto são necessárias algumas práticas, tais como:

- As operações de higienização devem ser realizadas por funcionários capacitados, e com frequência, a fim de evitar risco de contaminação dos alimentos.
- Os funcionários responsáveis pelas atividades de higienização devem utilizar uniformes apropriados para tais funções.
- As caixas de gorduras devem ser periodicamente limpas.
- A área de preparação de alimentos deve ser higienizada quantas vezes forem necessárias e imediatamente após o término do trabalho.

- Os produtos saneantes utilizados devem estar regularizados pelo Ministério da Saúde.
- Os utensílios e equipamentos utilizados na higienização devem ser próprios para a atividade.



### **COMO DEVE SER O LOCAL DE TRABALHO**

As propriedades produtoras de Queijo Minas artesanal de acordo com a Portaria 518 de 14 de junho de 2002 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) deverá dispor de:

- Curral
- Sala de Ordenha
- Queijaria

Nesta portaria ficam aprovada as normas sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do Queijo Minas Artesanal.

A propriedade deverá dispor de:

1. Curral de espera com bom acabamento, dotado de piso de concreto ou similar e de fácil higienização.
2. A sala de ordenha deverá ser de piso impermeável (cimento áspero ou similar) e de fácil higienização.
3. A cobertura deverá ser de telha de cerâmica, alumínio ou similares.
4. Estes locais deverão possuir ponto de água para manutenção das condições de higiene antes, durante e após a ordenha, dotada de rede de esgoto.



A queijaria deverá dispor dos seguintes ambientes:

- Área para recepção e armazenamento do leite
  - Área de fabricação e maturação
  - Área de embalagem e expedição
1. Área de recepção e armazenamento do leite; caso sejam próximas, a passagem do leite deverá ser realizada através de tubulação de material atóxico e de fácil higienização e se forem afastadas deverá possuir um tanque de recepção e armazenamento do leite.
  2. A queijaria deverá ser localizada distante de área que possa comprometer a qualidade do leite ou do queijo.
  3. A iluminação deverá ser natural ou artificial que possibilite a realização dos trabalhos e não comprometa a higiene dos alimentos;
  4. As instalações elétricas deverão ser embutidas ou exteriores revestidas por tubulações isolantes.
  5. A ventilação deverá ser adequada para evitar o calor excessivo, a condensação do vapor, o acúmulo de poeira e ar contaminado. O fluxo de ar não deve incidir diretamente sobre os alimentos.

6. A queijaria deverá ser coberta por uma estrutura metálica, calhetão ou laje.
7. O piso da queijaria deverá ser impermeável, antiderrapante e resistente ao trânsito e impactos, de fácil higienização e sem frestas.
8. As paredes das queijarias deverão de ser alvenaria impermeabilizada com tintas laváveis e de cores claras, pintadas até a altura não inferior a dois metros.
9. O teto deverá ser de acabamento liso, em cor clara, impermeável, de fácil higienização.
10. O piso, a parede e teto devem ser mantidos íntegros, conservados livres de rachaduras, trincas, goteiras, vazamentos, infiltrações, bolores, descascamentos, dentre outros e não devem transmitir contaminantes aos alimentos.
11. Deverão existir ângulos abaulados entre as paredes, paredes e o piso e entre as paredes e o teto.
12. As portas e janelas deverão ser ajustadas aos batentes pintadas com tintas laváveis e dotadas de tela á prova de insetos e roedores, de fácil remoção e limpeza.
13. A queijaria deverá possuir uma área restrita para higienização de pessoas, constituídas de lavatório para mãos e lava botas.
14. As instalações sanitárias, de uso pessoal deverão ser separadas dos locais de manipulação e da sala de ordenha, não sendo permitido o acesso direto a estes locais.



Vista de uma queijaria

## **MATERIAS E EQUIPAMENTOS NAS QUEIJARIAS**

Segundo a Portaria 518 de 14 de junho de 2002 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) as queijarias deverão dispor dos seguintes materiais e equipamentos

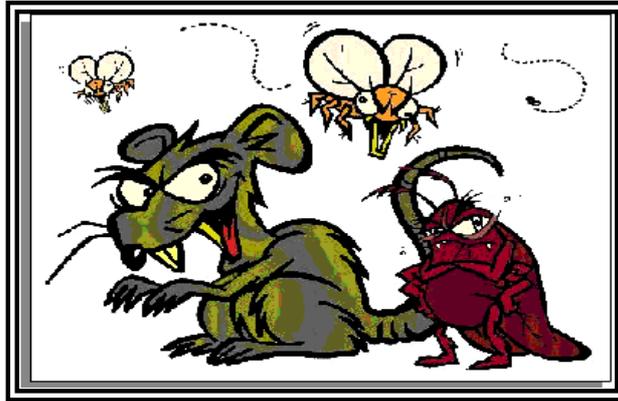
- Tanque de recepção de aço inox ou similar;
- Tanque de coagulação de aço inox ou similar;
- Coadores ou filtros de aço inox ou similar;
- Pás e liras (verticais e horizontais) de aço inox ou similar;
- Tanque com torneira de água corrente;
- As formas dos queijos de plástico, ou aço inox ou material similar de formato cilíndrico;
- As prateleiras de maturação constituídas de madeira, plástico ou material similar

**TODOS OS UTENSÍLIOS DEVERÃO PERMITIR UMA FÁCIL HIGIENIZAÇÃO, ESTAR EM PERFEITO ACABAMENTO COM SUPERFÍCIES LISAS E PLANAS, SEM CANTOS VIVOS, FRESTA, JUNTAS, POROS E SOLDAS SALIENTES.**



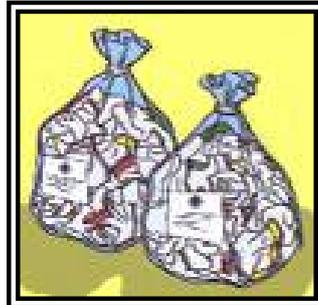
## COMBATE AS PRAGAS

Moscas, baratas, gatos e outros animais podem contaminar os alimentos, portanto devem ser evitados nos locais de preparo e estocagem de alimentos.



## ARMAZENAMENTO E EMBALAGEM

O produto final deverá ser acondicionado individualmente em embalagens adequadas e íntegras, preferencialmente em embalagens estéreis.



O armazenamento deverá ser realizado em local limpo e conservado, de forma organizada e sob temperatura adequada.



## TRANSPORTE DOS ALIMENTOS

O transporte deverá ocorrer na temperatura específica, em veículo limpo com ausência de vetores e pragas urbanas.



### ALGUMAS REGRAS DE OURO PARA O MANIPULADOR DE DERIVADOS DO LEITE

- **SEMPRE** lave bem as mãos antes e depois de manipular alimentos, e sempre depois de usar banheiro.
- **LEMBRE-SE:** todos os cortes ou machucados devem ser cobertos com bandagem à prova d'água.
- **MANTENHA-SE** sempre limpo (a), inclusive o seu uniforme.
- **MANTENHA** toda a superfície e peças dos equipamentos limpas, vá limpando enquanto trabalha.
- **JAMAIS** fume no local de trabalho ou nas suas proximidades.
- **NÃO** tossir ou espirrar sobre os alimentos.
- **MANTENHA** os alimentos cobertos, refrigerados.
- **MANTENHA** sempre que possível mantenha as mãos afastadas dos alimentos.
- **MANTENHA** o ambiente de trabalho sempre limpo.
- **NÃO** mexer em dinheiro.
- **USE SEMPRE** água tratada para a limpeza em geral e para a manipulação dos alimentos use água potável.
- **SEMPRE** que mexer ou servir alimentos utilizar utensílios higienizados.
- **NÃO** circular sem os uniformes adequados.

### **Dicas**

1. A edificação, as instalações, os equipamentos, os móveis e os utensílios devem ser livres de vetores e pragas urbanas.
2. O reservatório de água deve ser edificado e ou revestido de materiais que não comprometam a qualidade da água.
3. Os resíduos devem ser freqüentemente coletados e estocados em local fechado da área de preparação e armazenamento dos derivados do leite, de forma a evitar a contaminação dos alimentos.
4. Os visitantes destes estabelecimentos devem cumprir as mesmas normas de higiene e de saúde estabelecidos para os manipuladores.
5. Os transportes dos insumos devem ser realizados em condições adequadas de higiene e conservação.
6. A recepção da matéria prima dos ingredientes e das embalagens deve ser em área protegida e limpa. Estes deverão ser armazenados em local limpo e organizado.
7. A recepção da matéria prima (leite), ingredientes (coalho, sal ...) e embalagens devem ocorrer em área protegida, limpa e organizada.

**OBSERVAÇÃO: Esta cartilha foi baseada na portaria 518 de 14 de junho de 2002 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) vigorada no Estado de Minas Gerais, que dispõe sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas frescal**

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

HAZELWOOD, D. e MCLEAN, A. C. Manual de higiene para manipuladores de Alimentos; tradução: CESCHIN, J. A. , São Paulo: Livraria Varela, 1994.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CACHOEIRO DE ITAPEMIRIM – ES; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE – SEMUS; DIRETORIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – DIVISA. **Boas práticas de higiene e manipulação de alimentos.** 2007. Disponível em: [http://www.cachoeiro.es.gov.br/saude/vigilancia\\_sanitaria/Boas%20praticas%20de%20higiene%20e%20manipulacao%20de%20alimentos.pdf](http://www.cachoeiro.es.gov.br/saude/vigilancia_sanitaria/Boas%20praticas%20de%20higiene%20e%20manipulacao%20de%20alimentos.pdf). Acesso em: 10 de outubro de 2007.

PROJETO ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL – **Manual para manipuladores de alimentos.** Fundação Municipal de Saúde; Prefeitura de Teresina - PI, 2006. Disponível em: [http://saude.teresina.pi.gov.br/licitacoes/064-06/mqannual\\_para\\_manipuladores.pdf](http://saude.teresina.pi.gov.br/licitacoes/064-06/mqannual_para_manipuladores.pdf). Acesso em: 10 de outubro de 2007.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE – SP. Disponível em: [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/6C9590DEDEBD8AB68325743300574FAA/\\$File/Boas%20Pr%C3%A1ticas%20o%20que%20s%C3%A3o%20e%20o%20que%20fazer%20para%20aplic%C3%A1-las%20CONTINUA%C3%87%C3%83O.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/6C9590DEDEBD8AB68325743300574FAA/$File/Boas%20Pr%C3%A1ticas%20o%20que%20s%C3%A3o%20e%20o%20que%20fazer%20para%20aplic%C3%A1-las%20CONTINUA%C3%87%C3%83O.pdf). Acesso em 10 de outubro de 2007.

SERVIÇO SOCIAL DO COMÉRCIO – SESC, 2003. **Banco de Alimentos e Colheita Urbana: Manipulador de Alimentos I - Perigos, DTA, Higiene Ambiental e de Utensílios.** Disponível em: <http://www.mesabrasil.sesc.com.br/Cartilhas/Cartilha%20Manipulador%20I.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2007.

SERVIÇO SOCIAL DO COMÉRCIO – SESC, 2003. **Banco de alimentos e colheita urbana: Manipulador de alimentos II - Cuidados na Preparação de Alimentos.** Disponível em: <http://www.mesabrasil.sesc.com.br/Cartilhas/Cartilha%20Manipulador%20II.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2007.

SERVIÇO SOCIAL DO COMÉRCIO – SESC; UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAI – UNIVALI. **Cartilha do Manipulador de Alimentos.** Disponível em: <http://www.saudejoinville.sc.gov.br/visa/download/CartilhaAlimento.pdf>. Acesso em: 10 de outubro de 2007.

FAZENDA TAMANDUÁ. Paraíba, 2007. Disponível em: <http://www.fazendatamandua.com.br/coalho.htm>. Acesso em: 08 de outubro de 2007.

SÍTIO E CAPRIL SERRA NEGRA. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.sitioecaprilsserranegra.com.br/nc.html>.. Acesso em: 08 de outubro de 2007.

GAZETA DO POVO - VIDA PÚBLICA – O GLOBO ONLINE, 2007. Queijos recolhidos em Minas Gerais tinham diversas marcas. Disponível em: <http://blogsemacol.blogspot.com/2007/10/alimentos.html>. Acesso em: 02 de novembro de 2007.

### **Legislação Brasileira**

Portaria 518 de 14 de junho de 2002 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Dispõem sobre os requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal.

RDC 275 de 21 de outubro de 2002 – ANVISA /MS Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.

RDC 216 de 15 de setembro de 2004 – ANVISA/MS Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de alimentação.

### **ELABORADO:**

Juliana Fonseca Moreira da Silva

Anexo 4 – Trabalho publicado

Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento

Volume 10 - número 1 – pgs. 6 – 13

Março/2008

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* sp. DURANTE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO EM PALMAS - TO

Juliana Fonseca Moreira da Silva<sup>1</sup>, Hyana Alves Lustosa<sup>1</sup>, Cristiane Martins Coelho<sup>1</sup>, Raphael Sanzio Pimenta<sup>1</sup>, Paula Benevides de Moraes<sup>1</sup>, Ricardo Souza Dias<sup>2</sup>, Thaysa de Moraes Garofalo Fernandes<sup>2</sup>, Aparecido Osdimir Bertolin<sup>1</sup>  
 Universidade Federal do Tocantins - UFT  
 Programa de Mestrado em Ciências do Ambiente  
 Campus Universitário de Palmas, Palmas - TO, Brasil<sup>1</sup>;  
 Fundação Ezequiel Dias - Laboratório de Enterotoxinas (FUNED); Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix.  
 Belo Horizonte - MG, Brasil. <sup>2</sup>  
[biojuliana@yahoo.com.br](mailto:biojuliana@yahoo.com.br), [pimentars@uft.edu.br](mailto:pimentars@uft.edu.br); [drbertolin@uft.edu.br](mailto:drbertolin@uft.edu.br)

### RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da investigação da ocorrência de *Staphylococcus aureus* no processo de produção de queijo Minas Frescal produzidos e comercializados em Palmas-TO. Foi avaliada a contaminação durante o processo de produção do queijo Frescal em duas pequenas propriedades rurais no período de novembro de 2006 a abril de 2007. Análises microbiológicas de três coletas do leite in natura e pasteurizado, produto final (queijo) além de swabs das fossas nasais e leitos sub-ungüeaes dos ordenhadores e manipuladores. Todas as amostras de leite in natura revelaram a presença de *S. aureus*, sendo que na propriedade A a contagem foi de  $10^5$  UFC/ml e na propriedade B variou entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (resultados para amostra indicativa). Não foi observado crescimento de *Staphylococcus* sp. no leite pasteurizado proveniente da propriedade B. Todos os queijos apresentaram contagem de *Staphylococcus* sp. superior a  $10^3$  UFC/g, todas as amostras foram positivas para a presença da enterotoxina A (SEA). Em todos os ordenhadores e manipuladores do queijo foram detectados a presença de *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase positiva em todos os sítios amostrados (fossas nasais e leitos sub-ungüeaes). Nossos resultados indicam que os queijos são impróprios para o consumo humano por apresentar enterotoxina estafilocócica e *Staphylococcus* coagulase positiva com contagem superior ao estabelecido pela Legislação vigente (Resolução RDC n°12/2001 ANVISA/MS) indicando possíveis falhas nas etapas de seleção de matéria prima, fabricação e transporte que os tomam potenciais

problemas de saúde pública e constituindo um possível risco à saúde do consumidor.

**Descritores:** *Staphylococcus*, queijo, leite, manipuladores, TSST-1, enterotoxinas.

### ABSTRACT

This paper presents the results of an investigation of the occurrence of *Staphylococcus aureus* in the process of production of Minas Frescal cheese in Palmas - TO. We evaluated the contamination during the manufacturing process in two small rural properties in the period from November 2006 to April 2007. Microbiological analyses of three sampling collections included in natura milk, pasteurized milk, and final product (cheese), together with swab samples of nasopharyngeal and subungueal sites of milkers and manufacturers. All samples from in natura milk revealed the presence of *S. aureus*, from  $10^5$  CFU/ml in property A to  $10^6$  -  $10^7$  CFU/ml in property B (results recorded for indicator sample). No growth of *Staphylococcus* sp. was observed in pasteurized milk from property B. All cheese samples presented counts of *Staphylococcus* sp higher than  $10^3$  UFC/g, and were positive for enterotoxin A (SEA). All samples from milkers and manufacturers presented *S. aureus* or *Staphylococcus* coagulase positive in sites sampled (nasopharyngeal and subungueal sites). Our results indicate that cheese are improper for human consumption because they present staphylococcal enterotoxin and *Staphylococcus* coagulase positive in counts higher than that proposed by legal regulation (Resolução RDC n°12/2001 ANVISA/MS) indicating possible failure in the selection of

*materials, manufacturing and transportation that may cause public health problems as they constitute a possible risk to the consumers health.*

**Keywords:** *Staphylococcus*, cheese, milk, handlers, TSST-1, enterotoxins.

## INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados têm sido usados como alimento para a humanidade desde os primórdios da civilização. Devido ao seu alto valor nutritivo o leite pode ser considerado uma rica fonte de proteínas, lipídes, carboidratos, minerais e vitaminas. Com isto, o leite também pode ser considerado como sendo um meio excelente para crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis (Almeida et al., 1999) [1]. A presença de microrganismos indesejáveis no leite provoca alterações e limitam a sua durabilidade e conseqüentemente causam problemas econômicos e de saúde pública. Entre os derivados do leite, o queijo minas frescal merece destaque por ser um produto de fácil e rápida elaboração e conseqüentemente de baixo custo e menor qualidade higiênico-sanitária (Corbia et al., 2000) (Pinto et al. 1996) [10, 23].

Produtos lácteos deveriam ser produzidos a partir de leite pasteurizado e desta forma não deveriam apresentar nenhum microrganismo patogênico. Porém alguns produtos, principalmente o queijo minas frescal, em sua maioria, são fabricados a partir de leite in natura e desta forma proporcionam grande risco ao consumidor (Gonçalves et al. 1998) [13].

O queijo minas frescal apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação de bactérias que podem gerar intoxicações e ou infecções alimentares nos consumidores, principalmente por apresentar elevado teor de umidade e passar por intensa manipulação (Almeida Filho & Filho, 2000) (Salotti, et al. 2006) [2, 26]. O manipulador é normalmente uma das principais vias transmissão de microrganismos. Indivíduos doentes ou portadores assintomáticos de microrganismos patogênicos podem, em função de falhas higiênico-sanitárias durante a manipulação, contaminar os alimentos, dando origem a surtos de intoxicação alimentar (Rapini et al. 2005) [24].

O *S. aureus* e outros *Staphylococcus* coagulase positiva são frequentemente pesqui-

sados em queijos, pois a sua presença está associada á pratica de higiene e manipulação inadequadas e podem ainda produzir enterotoxinas termoestáveis causadoras de intoxicação alimentar (Leite et al., 2005) (Loguercio & Aleixo, 2001) [17, 19]. No homem, os *Staphylococcus* podem estar presentes em várias partes do corpo, tais como fossas nasais, leitos sub-ungüesais, mãos, garganta e feridas. A partir dessas localizações, o microrganismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (Rapini et al, 2005) [24].

Estes microrganismos são facilmente eliminados por tratamentos térmicos, mas as suas enterotoxinas são termoestáveis e permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor (Carmo et al., 2002) (Stanford et al., 2006) [7, 28]. Segundo Fagundes e Olivera 2004 [11], a enterotoxina mais freqüente associada à intoxicação alimentar por estafilococos é a do tipo A.

Este trabalho teve como objetivo verificar a incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de leite, queijo, manipuladores e ordenhadores, e verificar o potencial risco de intoxicação alimentar pela presença de enterotoxinas estafilocócicas no queijo frescal comercializado em Palmas-TO.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coletas

Foram realizadas três coletas em duas pequenas propriedades rurais (designadas A e B) produtoras de queijo minas frescal. Na Propriedade A coletou-se leite in natura, queijo e swab das fossas nasais e dos leitos sub-ungüesais do ordenhador e manipulador. Na propriedade B coletou-se leite in natura, leite pasteurizado, queijo, swab das fossas nasais e dos leitos sub-ungüesais do ordenhador e manipulador.

As coletas foram realizadas conforme metodologia descrita por Lancette & Bennett, (2001) [16] e Borelli, (2002) [4] as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFT onde foram realizadas as análises microbiológicas.

### **Análise microbiológica - leite**

As amostras ao chegarem ao Laboratório e foram processadas de acordo com metodologias propostas por Bergdoll (1989) [3], Kloos (1990) [15], Lancette & Bennett (2001) [16] e Lisita (2005) [18]. Foram retirados 25 ml do leite e realizadas diluições seriadas até  $10^{-6}$ , alíquotas de 100 l foram inoculadas sobre placas de Petri contendo ágar Baird-Parker e incubadas por 48 h a 37 °C. Para a contagem foram selecionadas as diluições que apresentaram entre 20 e 200 colônias, sendo contadas as colônias típicas e atípicas. Foram selecionadas 10 colônias com características típicas (coloração negra, brilho, puntiformes e circundadas por um halo de lipase e outro transparente mais externo de lecitina) em seguida foram transferidas para ágar tripton de soja (TSA) mantidas a 4 °C e em caldo infuso de cérebro – coração (BHI) acrescido de 50 % de glicerol e mantidos a -80 °C (Carmo et al., 2003; Cardoso et al., 2000) [9, 6]. Para a identificação, as culturas estocadas foram recuperadas, coradas pelo método de Gram e submetidas as seguintes provas bioquímicas: catalase, coagulase, hemólise, termonuclease, fermentação de açúcares (manitol e maltose) (MaC Faddin 1980; Sena, 2000) [20, 27]. As contagens de *Staphylococcus* sp. foram obtidas pela multiplicação do número de colônias obtidas pelo fator de diluição utilizada e os resultados expressos como UFC/ml.

### **Análise microbiológica - queijo**

As amostras de queijo foram submetidas aos mesmos procedimentos aplicados para as amostras de leite, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1 % (Carmo et al., 2002) [8]. A partir deste volume foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-6}$ , em seguida uma alíquota com 100 l de cada diluição foi inoculada em placas de Petri contendo ágar Baird-Parker e incubadas por 48 h a 37 °C. Após este período foi realizada a contagem e os resultados expressos em UFC/g. As colônias foram selecionadas e armazenadas como acima descrito e submetidas posteriormente às provas bioquímicas para identificação (MaC Faddin, 1980; Sena, 2000) [20, 27].

### **Análise microbiológica – swabs manipulador e ordenhador**

A coleta dos swabs das cavidades nasais e leitões sub-ungües foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Carmo et al. (2003) [9]. Os manipuladores e ordenhadores foram submetidos à inspeção visual quanto à presença de sinais clínicos de infecções aparente. O material obtido foi transferido para tubos contendo caldo tripton de soja (TSB) acrescido de 10 % de NaCl e incubados por 24 h a 37 °C. Posteriormente, as culturas foram plaqueadas em ágar Baird-Parker e incubadas por 48 h a 37 °C. Os isolados foram selecionados e armazenados como acima descrito e submetidas posteriormente às provas bioquímicas para identificação (MaC Faddin, 1980; Sena, 2000) [20, 27].

### **Pesquisa de enterotoxinas no queijo pelo método de Sensibilidade Ótima em Placa (OSP)**

Uma alíquota do queijo amostrado foi mantida em sua embalagem original e congelada para posterior realização da pesquisa de enterotoxinas pelo Serviço de Microbiologia de Produtos –Laboratório de Enterotoxinas - Fundação Ezequiel s na Fundação Ezequiel Dias FUNED/MG. Para tanto foram pesados 25 g do queijo e adicionada 40 ml de água destilada estéril pré-incubada a 37 °C; centrifugou-se por 15 min a 3.000 rpm e ajustou-se o pH para 4,0, o sobrenadante foi filtrado e novamente o pH ajustado para 8,0, posteriormente foi realizada uma nova centrifugação por 15 min a 3.000 rpm, filtração e uma nova transferência do sobrenadante para um frasco de vidro com tampa, onde foi acrescido 20 l de timerosol 1:1.000 como conservante (Carmo, 2000) [7].

Os sobrenadantes obtidos foram submetidos ao método Sensibilidade Ótima em Placas (OSP), segundo metodologia descrita por Sena (2000) [27] e Ornelas (2005) [22].

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as amostras de leite in natura analisadas foram positivas para a presença de *Staphylococcus* sp., A maioria das cepas isoladas foram caracterizadas como coagulase

positiva sendo que destas 46 foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, 5 como *Staphylococcus sp.* coagulase positiva e somente 9 isolados foram coagulase negativa (tab. 1).

Das amostras de leite in natura provenientes da Propriedade A, foram obtidas contagens iguais a  $10^5$  UFC/ml de *Staphylococcus aureus*. Já na Propriedade B esta contagem variou de  $3 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$ . Estes resultados evidenciam um número elevado deste microrganismo e indicam que a matéria prima utilizada na fabricação do queijo não se encontra em condições higiênic-sanitárias adequadas. A legislação sanitária (RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001) [5] não prevê o monitoramento de *Staphylococcus sp.* em leite in natura e sim em leite pasteurizado ou UAT, uma vez que esta resolução estabelece padrões microbiológicos para produtos expostos a venda e não para matéria prima. No entanto, a maioria dos queijos minas frescais são produzidos com leite in natura.

Das amostras de leite pasteurizado provenientes da Propriedade B não foram observados o crescimento de cepas de *Staphylococcus sp.* ao contrário do observado no leite in natura. Estes dados confirmam a necessidade de se utilizar somente o leite pasteurizado na elaboração deste tipo de queijo, uma vez que um leite contaminado irá influenciar negativamente a qualidade e a segurança alimentar do produto final.

Nas coletas realizadas nos manipuladores e ordenhadores foram obtidas cepas de *S. aureus* ou *Staphylococcus sp.* coagulase positiva em todos os sítios amostrados (Tab. 2 e 3). Segundo Neto et al, (2002) [21] todos os *Staphylococcus* coagulase positiva, são possíveis produtores de enterotoxinas. Sendo assim, a presença destes microrganismos em todos os manipuladores e ordenhadores assim como no leite utilizado na produção do queijo indica um eminente risco de intoxicação alimentar para a população consumidora. No entanto, existem relatos de produção destas toxinas mesmo por cepas coagulase negativas (Rapini et al. 2005) [25].

A freqüência de *S. aureus* nas fossas nasais dos ordenhadores foi elevada, assim como nos leitões sub-ungueais durante a ordenha, o que pode possibilitar a contaminação do leite

durante este processo. Contudo, a utilização de testes moleculares, como o pulsed field, poderiam evidenciar se a origem da contaminação do leite está associada aos ordenhadores ou se a origem das bactérias está relacionada diretamente com os animais produtores Fueyo et al. (2001) [12].

Todos os manipuladores apresentaram *Staphylococcus* coagulase positiva nas fossas nasais e leitões sub-ungueais mesmo após assepsia. Este fato pode explicar a detecção destas bactérias mesmo no queijo produzido com o leite pasteurizado, e sugere que provavelmente há uma recontaminação durante o processo de fabricação nas duas propriedades amostradas.

Este estudo permitiu a observação de que a pasteurização do leite por si, não é suficiente para eliminar ou reduzir as contagens de *Staphylococcus* no queijo, uma vez que foram observados no produto final das duas propriedades contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superior ao permitido pelo Ministério da Saúde (RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001) [5], para o queijo minas frescal (tab.4).

Em relação à detecção de enterotoxinas, observou-se que todas as amostras de queijo foram positivas para a enterotoxina estafilocócica A (SEA), não havendo positividade para as outras enterotoxinas e nem para a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Resultados semelhantes foram observados por Rapini et al. (2002) [25], Lara et al. (1980) [14] e Ornelas (2005) [22] em estudos com outros queijos produzidos a partir do leite in natura. No entanto, observamos que além da pasteurização do leite outros métodos de controle de microrganismos devem receber igual atenção para se evitar a contaminação do queijo em etapas posteriores ao tratamento térmico.

## CONCLUSÕES

A contaminação dos queijos frescais por *Staphylococcus sp.* pode ser explicada pelo fato das principais fontes de contaminação do queijo serem o leite cru e ou a manipulação inadequada por pessoas portadoras deste microrganismo.

Na propriedade B, apesar do queijo ser produzido a partir de leite submetido a pasteurização lenta, o que se pode observar que a con-

taminação ocorreu novamente após este processo, durante a sua produção ou estocagem.

Todos os queijos analisados foram considerados impróprios para o consumo humano de acordo com a legislação vigente desta forma evidenciando a importância de se realizar um rigoroso controle de qualidade em todas as etapas de produção do queijo minas frescal.

Este trabalho evidenciou a presença por *S. aureus* no leite, destinado a fabricação de queijos, em ordenhadores, manipuladores e no próprio produto final e foi detectada a presença de enterotoxina A (SEA) em todas as amostras de queijo analisadas o que pré-supõe um grave risco a saúde dos consumidores.

Tabela 1. Frequência de *Staphylococcus* sp. isolados de leite *in natura* nas propriedades A e B.

	N	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positiva	<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativa
Propriedade A	30	21	5	4
Propriedade B	30	25	0	5
Total	60	46	5	9

Tabela 2. Frequência de isolamento de espécies de *Staphylococcus* em diferentes sítios do manipulador e ordenhadores da propriedade A.

	Sítio de coleta	N	Espécie	F	F (%)
Ordenhador A	Fossas nasais	30	<i>S. aureus</i>	30	100
	Leitos sub-ungüeaes durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i> <i>S. saprophyticus</i>	13 17	43 57
Ordenhador B	Fossas nasais	30	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa <i>S. aureus</i>	9 21	30 70
	Leitos sub-ungüeaes durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i> <i>S. saprophyticus</i>	25 5	83 17
Manipulador	Fossas nasais	30	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa <i>S. aureus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	3 9 5 7 6	10 30 17 23 20
	Leitos sub-ungüeaes após assepsia	30	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	14 6 10	47 20 33

N = Tamanho da amostra, F = frequência de isolamento, F(%) = Frequência relativa.

Tabela 3. Frequência de isolamento de espécies de *Staphylococcus* em diferentes sítios do manipulador e dos ordenhadores da propriedade B.

	Sítio de coleta	N	Espécie	F	F (%)
Ordenhador	Fossas nasais	30	<i>S. aureus</i>	12	40
			<i>S. epidermidis</i>	10	33
			<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	2	7
			<i>S. saprophyticus</i>	6	20
	Leitos sub-ungüeaes durante a ordenha	30	<i>S. aureus</i>	11	37
			<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	6	20
			<i>S. epidermidis</i>	5	17
			<i>S. saprophyticus</i>	8	26
Manipulador	Fossas nasais	30	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	3	10
			<i>S. aureus</i>	23	77
			<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	4	13
	Leitos sub-ungüeaes após assepsia	30	<i>S. aureus</i>	9	30
			<i>S. saprophyticus</i>	7	23
			<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	3	10
			<i>S. epidermidis</i>	3	10
			<i>S. carnosus</i>	5	17
			<i>S. saccharolyticus</i>	1	3
			<b><i>Staphylococcus</i> c o a g u l a s e p o s i t i v a</b>	2	7

N = Tamanho da amostra, F = frequência de isolamento, F(%) = Frequência relativa.

Tabela 4. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas em queijos frescais produzidos em Palmas-TO.

	Queijos	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/g)	Enterotoxinas e TSST-1
Propriedade A	1	$3,7 \times 10^7$	A
	2	$4,4 \times 10^7$	A
	3	$8,5 \times 10^7$	A
Propriedade B	1	$4,7 \times 10^7$	A
	2	$5,4 \times 10^7$	A
	3	$1,7 \times 10^7$	A

## REFERÊNCIAS

- [1] ALMEIDA, A. C.; SILVA, G. L. M.; SILVA, D. B.; FONSECA, Y. M.; BUELTA, T. T. M.; FERNANDES, E. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de alfenas, MG. *Revista Universidade Alfenas*. n. 5, p.165-1688, 1999.
- [2] ALMEIDA FILHO, E. S.; FILHO, A. N.. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Revista Saúde Pública*, v. 34, n.6, p. 578-580, 2000.
- [3] BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker, p.463-523, 1989.
- [4] BORELLI, B. M. Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra – MG. 2002. 109p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- [5] BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, publicada no Diário Oficial da União de 30 de janeiro de 2001.
- [6] CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S. and SILVA, N. Detecção da Toxina-1 da Síndrome do Choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia* v.52, n.1, p.07-10. 2000.
- [7] CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; ANUNCIAÇÃO, L.L.C. et al. Staphylococcal food poisoning outbreak involving 42 people at a restaurant in the Municipality of Passos, MG. Brazil. *Veterinary Microbiology*, Accepted, 2000.
- [8] CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M. and HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and rawmilk in Brazil. *Food Microbiology* v. 19. p. 9-14, 2002.
- [9] CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. An outbreak of Staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. *Brazilian archives of biology and Technology*, v. 46, n.4, p. 581-586, dec. 2003.
- [10] CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, M. G. F.; OLIVEIRA, C. Z. F.; NASCIMENTO, E. R. *Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos. Seropopéia: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa-CNPAB. Documentos,114) 15p. Dez. 2000.
- [11] FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções Internacionais mamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas aplicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p. 1315-1320, 2004.
- [12] FUEYO, J. M.; MARTINS, M. C. GONZALEZ-HEVIA, M.A. et.al. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *International Journal Food Microbiology*, v.67, p. 139-145, 2001.
- [13] GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. *Revista Higiene Alimentar*, v. 12, n. 53, p. 38-43, 1998.
- [14] IARA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M. L. C.. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. *Revista Saúde Pública*. S.Paulo, v.14 p.93-100,1980.
- [15] KLOOS, W.E. Systematics and natural history of Staphylococci. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* v.70, n.3, p.255-375, 1990.
- [16] LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P., ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association,. 4. ed, , Washington, D.C., USA, 2001. chapter 39, p.387-403.

- [17] LEITE, M. M. D.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas tipo frescal. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n. 132, p. 89-93, 2005.
- [18] LISITA, M. O. Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios. 2005. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba-São Paulo, 2005.
- [19] LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. *Revista Ciência Rural – Santa Maria*, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.
- [20] MAC FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2.ed. Baltimore Williams & Wilkins: 1980, p.527.
- [21] NETO, A. C.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil*. *Ciência Tecnologia Alimentar* v. 22, n 3, p. 263-271, 2002.
- [22] ORNELAS, E. A. Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra – MG. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal). Instituto de Veterinária da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- [23] PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da vigilância sanitária. *Revista Higiene Alimentar*, v. 10, n. 44, p. 22-35, 1996.
- [24] RAPINI, L. S.; FEIJO, L.D. ; VERAS, J.F. et al.. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp e *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. *Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes*, v.57, p.60-65, 2002.
- [25] RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; VERAS, J. F.; SOUZA, M. R. R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 57, n.6, p.825-829, 2005.
- [26] SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A.C. F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arquivo Instituto Biológico São Paulo*, v.73, n.2, p.171-175, 2006.
- [27] SENA, N. J. Perfil epidemiológico, resistência de antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* spp isolados de queijo coalho comercializados em Recife-PE.2000. Tese (Doutorado em Tecnologia de Carne, leite e derivados). Instituto de veterinária da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- [28] STANFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Ciência Tecnologia Alimentar*, Campinas, v.26, n.1, p.41-45, 2006.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)