



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

Alessandro Primo da Cunha

**PRESENÇA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO**  
**MINAS FRESCAL ARTESANAL**

Uberlândia  
OUT/2012

Alessandro Primo da Cunha

**PRESENÇA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO  
MINAS FRESCAL ARTESANAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Uberlândia  
OUT/2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

C972p Cunha, Alessandro Primo da, 1971-  
2012 Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo  
mi-  
nas frescal artesanal / Alessandro Primo da Cunha. -- 2012.  
48 f.

Orientador: Carlos Ueira Vieira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Estafilococos áureos -  
Teses.  
3. Queijo-de-minas - Teses. 4. Antibióticos - Teses. I. Vieira,  
Car-  
los Ueira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa  
de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:

**Alessandro Primo da Cunha**  
**Mestrando**

APROVADA EM: ...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Cristina Soares de Sousa

---

Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

---

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

---

Co-orientadora: Prof a. Dra. Maria Aparecida Rodrigues

*Dedico este trabalho em especial a meus queridos afilhados Pedro Primo, André e Mateus. Um carinho especial a minha afilhada Carolina e a meus pais Pedro Primo (in memorian), e Izabel. Saibam que vocês fazem parte desta conquista. Amo Vocês!*

## **AGRADECIMENTOS**

Não poderia iniciar esta parte do meu trabalho de outra forma, em primeiro lugar quero agradecer a Deus, que permitiu que esse meu grande sonho pudesse se tornar realidade, que me deu forças para chegar até aqui estando presente em cada momento da minha vida me fazendo acreditar que é possível;

Aos meus irmãos (Ana Maria e André Luís) que mesmo distantes e alguns momentos sempre me apoiaram e incentivaram durante minha jornada;

Em especial a meus pais Pedro (*in memoriam*), e Izabel que sempre me apoiaram e em fizeram acreditar é das dificuldades que nos fortalecemos e nos tornamos pessoas melhores, toda coragem, perseverança e dedicação que tenho aprendi com vocês;

Agradeço a todos os meus amigos, colegas de trabalho e colaboradores da minha pesquisa, pela força, carinho e atenção que sempre dedicaram a mim, me apoiando e incentivando, em especial a meus colegas do Laboratório de controle de qualidade em saúde – Vigilância Sanitária de Uberlândia – MG;

Ao meu orientador, o professor Dr. Carlos Ueira Vieira e minha Co-orientadora professora Maria Aparecida Rodrigues pela paciência, atenção, carinho, dedicação e cuidados durante a realização desse projeto. Por estarem sempre disponíveis para me auxiliar, por todos os conhecimentos transmitidos durante todo o curso e por ser um modelo para todos nós que estamos seguindo nessa caminhada.

## RESUMO

Dentre os micro-organismos mais importantes encontrados em queijos, estão os *Staphylococcus aureus*, que são transmitidos pelo leite contaminado e/ou pela manipulação inadequada. Foram realizadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em 117 amostras de Queijo Minas Frescal em 38 cidades e 1 distrito no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba MG, entre agosto/2009 a dezembro/2011. Identificou-se *Staphylococcus* coagulase positiva em 65 amostras (55,55%), com 23 amostras (19,67%), impróprias para consumo humano, contagens acima de limite tolerado pela legislação  $5 \times 10^2$  UFC/g. No antibiograma as 65 amostras apresentaram perfil de sensibilidade a todos os antibióticos testados (beta-lactâmicos - Cefaloxina, Oxacilina, Penicilina) e aos grupos de glicopeptídios (Vancomicina e Teicoplanina), com exceção de 15 amostras que se mostraram resistentes a Penicilina. Os resultados apontam para a presença frequente desse micro-organismo no produto estudado, sem que haja cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva multirresistentes.

Palavras Chaves: Queijo, *Staphylococcus* sp, antibióticos, resistência.

## ABSTRACT

The most important micro-organisms found in cheeses are *Staphylococcus aureus*, which are transmitted by contaminated milk and/or mishandling. In this work we performed a microbiologic assay in 117 samples Cheese Mines Frescal in 38 cities and one district in Triangulo Mineiro and Alto Paranaíba MG, between the December/2011 August/2009. We identified *Staphylococcus* coagulase positive in 65 samples (55.55%), with 23 samples (19.67%), unfit for human consumption, counts above threshold tolerated by law  $5 \times 10^2$  UFC/g. In the 65 samples showed antibiogram profile sensitivity to all antibiotics tested (beta-lactams -Cefaloxina, oxacillin, penicillin) and groups of glicopeptídios (vancomycin and teicoplanin), with the exception of 15 samples that were resistant to penicillin. It was not found strains of multiresistant *Staphylococcus* coagulase positive. The results point to the frequent presence of this micro-organism in the product studied, when compared with other studies.

Key Words: Cheese, *Staphylococcus* sp, antibiotics, resistance.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

Kg	Kilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
Aa	Atividade de Água
Apud	Expressão latina para referenciar um autor cuja obra não se teve acesso, porem seu trabalho foi citado por um autor que se teve acesso
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Caldo Infuso Cérebro Coração
Cm	Centímetro
CRF	Fator de Reação de Coagulação
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
et al.	E colaboradores
ECP	Estafilococos Coagulantes Positiva
EE	Enterotoxinas estafilocócicas
EEA	Enterotoxinas estafilocócicas tipo A
EEB	Enterotoxinas estafilocócicas tipo B
EEC	Enterotoxinas estafilocócicas tipo C
EED	Enterotoxinas estafilocócicas tipo D
EEE	Enterotoxinas estafilocócicas tipo E
FAMEV	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia
G	Grama
G	Aceleração relativa da gravidade
Hs	Horas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LCQS	Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRSA	Methicilin Resistent <i>Staphylococcus aureus</i>
MHA	Agar Mueller-Hinton
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standards
Nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
NaCl	Cloreto de Sódio

pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PBP	Protein Biding Penicillins
Pb	Par de Base
PMU	Prefeitura Municipal de Uberlândia
Sp	Espécie
TNase	Endonuclease Termoestável
VISA	Vigilância Sanitária
UI/mL	unidade internacional por mililitro
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFC/g	Unidade formadora de colônia por grama
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UV	Ultra Violeta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Composição química do leite	13
<b>Figura 2:</b> Locais de Coleta na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	26
<b>Figura 3:</b> colônias típicas (A) e atípicas (B) de crescimento de <i>Staphylococcus</i> sp em Ágar Baird Parker.	27
<b>Figura 4-</b> Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	28
<b>Figura 5:</b> Teste de coagulase para <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (A) e <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (B)	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores mínimo e máximo de contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, abaixo do limite tolerado pela legislação brasileira, por cidade	32
<b>Tabela 2:</b> Relação de cidades onde as amostras coletadas não evidenciaram contaminação por <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.	33
<b>Tabela 3:</b> Relação geral de resultados obtidos e outros contaminantes	33
<b>Tabela 4:</b> Suscetibilidade aos antimicrobianos (Cefaloxina, Oxacilina, Penicilina, Vancomicina, Teicoplanina) dos isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, obtidos das amostras analisadas.	35

## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Considerações gerais sobre as condições higiênico-sanitárias de queijo minas frescal artesanal .....	12
1.2. Produção de queijo artesanal.....	15
1.3. Considerações gerais sobre <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
2.1. Objetivo geral .....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1. Material.....	26
3.2 . Preparo das Amostras / Contagem direta em placas de <i>Staphylococcus sp.</i> .....	28
3.2.1. Coloração de Gram.....	29
3.2.2. Provas Bioquímicas.....	29
3.4. Teste de sensibilidade antimicrobiana.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	32
4.1. Verificação da viabilidade e pureza de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	32
4.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO I</b> .....	48

## **1– INTRODUÇÃO**

### **1.1 Composição química e propriedades gerais do leite**

O leite é considerado o alimento mais completo existente para o consumo humano, sendo consumido por crianças de todas as idades, idosos e convalescentes, grupos nos quais o leite deve fazer parte integrante da dieta. Por ser considerado um alimento completo, com elementos nutricionais e possuir alto valor biológico, é um excelente substrato para vários micro-organismos. Por este motivo o leite deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até a ocasião de seu beneficiamento, garantindo assim as características físicas, químicas e nutricionais do produto final, desta forma a indústria leiteira deve ser vista como um grande processo, desde a origem do produto, ainda nas propriedades rurais até sua chegada ao comércio varejista como produto industrializado, na forma de leite pasteurizado ou produto derivado (GERMANO; GERMANO, 2008; OLIVEIRA, 2001).

Os componentes do leite estão representados na figura 1. O leite varia de acordo com as necessidades a serem supridas por cada mamífero. Há uma grande variação no equilíbrio dos componentes, embora a composição seja basicamente a mesma. A quantidade de leite produzida e sua composição apresentam variações de importância econômica e tecnológica, ocasionadas por diversos fatores como: espécie, raça, fisiologia do animal, alimentação, estações do ano, doenças do animal, período de lactação, ordenhas e adulterações (TRONCO, 2010; PEREIRA, 2008)



**Figura 1:** composição química do leite.

Fonte: Adaptado de Pereira, 2008.

No que se refere as propriedades físico-químicas do leite, há uma variação de acordo com a classificação proposta pela legislação brasileira, ou seja, leite cru refrigerado, leite pasteurizado integral, semi-desnatado e desnatado.

Segundo Pereira 2008, a acidez natural do leite varia entre 0,13 e 0,17%, expressa como ácido láctico, e tem sua elevação determinada pela hidrólise da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida do leite. O pH varia entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20°C.

A densidade do leite varia entre 1,023 e 1,040 g/mL a 15°C e o valor médio é 1,032 g/mL. Leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade em relação a leite com baixo teor de gordura, em razão do aumento do extrato seco desengordurado que acompanha o aumento no teor de gordura. O ponto de congelamento aproximado de -0,531°C, é verificado em razão da depressão do ponto de congelamento causada pela lactose (0,296°C), pelos sais (0,119°C) e por outros constituintes dissolvidos (uréia, dióxido de carbono). Esses valores dependem de diversos fatores relacionados com o animal, ambiente, processamento industrial e técnicas crioscópicas.

O leite apresenta viscosidade mais alta que da água, em razão da presença de proteínas e lípidos, podendo sofrer alterações com o processamento industrial.

O que define a afinidade dos consumidores pelo produto são suas características sensoriais e a associação de atributos como frescor e valor nutritivo.

O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor pouco pronunciado, primariamente devido a relação entre lactose e cloretos, apresentando-se como doce e salgado, não ácido e não amargo, podendo ser afetado em condições como a ocorrência de mamite. Sabores e odores pronunciados em leite fresco são usualmente devidos à alimentação (ração, silagem) e ao ambiente de ordenha. A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio. A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz. A cor amarelada é devida ao pigmento caroteno, o qual é lipossolúvel. Cores anormais podem resultar de desenvolvimento microbiano (SILVA et al.2008).

Depois de secretado no do úbere, o leite pode ser contaminado por micro-organismos a partir de três principais fontes: de dentro da glândula mamária, da superfície exterior do úbere e tetos, e da superfície do equipamento e utensílios de ordenha e tanque (SANTOS; FONSECA, 2001).

O desenvolvimento de micro-organismos no leite, sejam estes provenientes de culturas lácticas selecionadas ou contaminantes, contribui para alteração do complexo enzimático existente. A atividade dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio (temperatura, pH, acesso ao substrato), alteráveis pelo processamento tecnológico. Numerosas enzimas podem ser encontradas no leite, como lipases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase. (HARSTED; HAUG; HOSTMARK, 2007).

Como parte do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, entrou em vigor, a partir de 1º de janeiro de 2012, a Instrução Normativa N° 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, com objetivo fixar os requisitos mínimos que devem ser observados para a produção, a identidade e a qualidade do leite para o comércio nacional, as principais mudanças que esta nova Instrução Normativa traz é a adoção de parâmetros de qualidade como a contagem bacteriana total, a contagem de células somáticas, entre outros. Segundo esta Instrução Normativa entende-se como leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda.

A legislação que começou a valer em 1º de janeiro de 2012 e prevê novos parâmetros para Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), refletindo negociações entre governo e setor produtivo. Com a medida, o Ministério alinhou o pedido de produtores que não conseguiram cumprir o prazo para redução dos limites previstos à proposta do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite.

Os padrões estão em processo de implantação gradativa desde 2002. Com a atualização, os índices de CBT e CCS que podiam chegar a 750 mil/ml, passam a ter como limite máximo 600 mil/ml. Os produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste precisam cumprir a determinação a partir deste domingo. Os do Norte e Nordeste do país cumprem a mesma exigência a partir de janeiro de 2013.

A edição da norma passa a escalonar os prazos e limites para a redução de CBT e CCS até o ano de 2016, chegando a 100 mil/ml e 400 mil/ml, respectivamente. Além disso, esta instrução suprime os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos leites tipos “B” e “C”.

A importância da pecuária de leite no desempenho econômico e na geração de empregos no país é incontestável, dados do último Censo Agropecuário do IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE/Pesquisa da Pecuária Municipal, atualizado em fevereiro de 2012, mostram que entre os anos de 2005 a 2010 foram produzidos 32.297.240 mil litros de leite. E, especificamente, na mesorregião do triângulo Mineiro e Alto Paranaíba – MG houve um volume de leite produzido de 2.093.463 mil litros em 2010, com estimativa de 2.193.337, uma taxa de crescimento entre os anos de 2005 a 2011 de 4,8. Segundo esse mesmo órgão o Brasil em 2008 produziu 640 mil toneladas de queijos (EMBRAPA, 2012).

## **1.2. Produção de queijo artesanal**

O Brasil hoje é auto-suficiente em produtos lácticos, abastecendo a população e exportando uma pequena quantidade (em torno de 3%), e a Região Sudeste a maior produtora brasileira de leite, respondendo por 37,7% da produção nacional. (GOMES, 2009).

Uma das formas mais antigas formas de conservação do leite é sob a forma de queijo, pois este surgiu praticamente com a domesticação de animais produtores de leite. O queijo, como muitos outros artigos de consumo pode constituir um índice de progresso de um povo; quanto maior a civilização de um povo, mais finos os tipos de queijos fabricados por eles (BEHMER, 1999).

A agroindústria familiar de pequeno porte produtora de queijos possui grande relevância na construção de um modelo de desenvolvimento regional mais equilibrado associado à sua importância social, econômica e ambiental (PREZOTTO et al., 2002). Na década de 1990, esse empreendimento tornou-se importante por promover o desenvolvimento do meio rural, com a geração de renda para proprietários, geração de empregos, descentralização das atividades, redução do êxodo rural e contribuição para auto-suficiência de produtos *in natura* e processados. Assim, observou-se a inclusão social e econômica de pequenos agricultores, melhoria das condições para a permanência no campo e melhoria da qualidade de vida (BUAINAIN et al., 2003; WESZ JUNIOR; TRENTIN, 2004; VINHA, et al., 2010).

Entre os agricultores familiares, a pecuária de leite é uma das principais atividades desenvolvidas, presentes em 36,00% dos estabelecimentos classificados como de economia familiar (ZOCCAL, 2007). Essa atividade tornou-se estratégica na agropecuária, pois mesmo em valores baixos, permite uma renda quinzenal ou mensal a família suprimindo as despesas básicas (SALVESTRO et al., 2009). O Ministério do Meio Ambiente, através da Secretaria de Políticas para o Desenvolvimento Sustentável, desenvolve normas e estratégias para harmonizar a relação entre o setor produtivo da economia e o meio ambiente (CASTELÕES, 2012).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil. Apesar da legislação brasileira, exigir a utilização de leite pasteurizado no seu preparo é bastante comum a comercialização do queijo fresco sem atender esta especificação.

Entre os queijos produzidos nas agroindústrias familiares, o queijo minas fresco é amplamente difundido no Estado de Minas Gerais pela tradição cultural, pelo melhor rendimento e pela demanda do consumidor. A fabricação de queijo minas fresco foi iniciada no século XVIII, nas regiões em que as criações de gado de leiteiro predominavam. A técnica foi introduzida no país por imigrantes

dinamarqueses e holandeses na região sul de Minas Gerais e Serra da Mantiqueira e foi difundida para o território nacional. Hoje, a fabricação de queijos, com tecnologia repassada de geração a geração, ainda é muito valorizada por fazer parte da cultura dessas regiões. A produção desse tipo de queijo apresenta retorno de investimento mais rápido, menor preço para o consumidor, processamento simples, ausência de período de maturação e um bom rendimento na fabricação, entre 6,0 kg e 6,5kg de leite por 1kg de queijo (FURTADO, 2005).

De acordo com a legislação bromatológica (RIISPOA, 1952), os queijos devem ser inspecionados, por órgão governamental, em todas as fases, começando pela propriedade rural, onde o leite ou o queijo caseiro é obtido, até as indústrias e os locais onde são expostos ao consumo (RIISPOA, 1952 e SILVA, 1997), e o selo de inspeção municipal, estadual ou federal no produto permite sua comercialização no âmbito do município, do Estado ou do país, respectivamente.

Segundo o MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2003), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial, ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade aceitável para o uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

O queijo tipo mussarela e queijo tipo Minas Frescal são os mais populares e de maior produção e consumo no país (75% do total de queijos), sendo consumido por todas as camadas da população. Em 2004 este produto representou 32,5% da produção nacional de queijos (EMBRAPA, 2009).

O queijo Minas Frescal possui baixo custo decorrente da simplicidade de sua produção, que na maioria das vezes é feito de forma caseira, com utilização de leite cru, sem higiene adequada e falta de condições no transporte e estocagem. Tais fatores contribuem para o crescimento microbiano, comprometendo a qualidade do produto e conseqüentemente, prejudicando a saúde do consumidor (RODRIGUES et al., 1995).

Sendo produtos de massa crua, com alto teor de umidade (46 a 55%), não maturado, devem ser consumidos nos primeiros quinze dias após sua fabricação, pois é altamente perecível mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2003, PERRY,

2004, FURTADO, 2005). O Queijo Minas Frescal artesanal não é padronizado apresentando variações consideráveis em relação aos teores de gordura e proteínas, apresenta de 12 a 18% de proteína (ROSA, 2004, MACHADO et al. 2004, MARQUES; OLIVEIRA, 2004); gordura de 20,5% a 29,22% (ROSA, 2004, MACHADO et al., 2004).

Segundo Oliva, et al. (2006), o Queijo Minas Frescal, é o principal queijo produzido com leite cru e comercializado de forma informal, em feiras, mini-mercados e até diretamente nas fazendas, o que oferece grande risco a saúde devido a ingestão de elevada carga bacteriana e micro-organismos patogênicos. Este produto, geralmente é comercializado em embalagens plásticas comuns, sem uma prévia desinfecção, amarradas ou fechadas com fechos metálicos, essa embalagem se apresenta com um depósito de soro exsudado que decorre do excesso de umidade, proporcionando um aspecto pouco atraente ao produto, e favorecendo a proliferação de micro-organismos contaminantes, e causando odores desagradáveis, o que reduz a vida útil do produto, mesmo em temperaturas adequadas.

Dentre os microrganismos mais importantes encontrados em leite e derivados, como os queijos, estão os *Staphylococcus aureus*, que podem ser transmitidos tanto pelo leite contaminado por vacas que apresentem mastite estafilocócica como pela manipulação e contaminação através do ser humano (GERMANO; GERMANO, 2001).

A presença desse microrganismo nos produtos lácteos, sob condições apropriadas, pode determinar a produção de enterotoxinas termoestáveis e causar surtos de intoxicação alimentar. A intoxicação ocorre após consumo de alimentos contaminados submetidos a tratamento térmico inadequado ou mantidos sob condições favoráveis a multiplicação da bactéria e produção da toxina (CERESER et al., 2011, ALMEIDA; FRANCO, 2003).

Intoxicações estafilocócicas atribuídas ao consumo de queijos têm sido relatadas em várias partes do mundo (ICMSF, 1996; ALTEKRUSE et al., 1998; MEYRAND; VERNZOY- ROZAND, 1999; De BUYSER et al., 2001; HUI et al., 2001; LECLERC et al., 2002). No Brasil, surtos de intoxicações estafilocócicas são associados, principalmente, ao consumo de queijos do tipo Minas Frescal e Minas Padrão (CARMO et al.; 2002).

Ao se observar intoxicações estafilocócicas no Brasil é desconhecida sua real estatística, devido a erros de diagnósticos, por serem similares a outras intoxicações (*Bacillus cereus* - toxina do vômito); por coletas inadequadas, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos, e por ser uma doença de notificação não compulsória (SANTANA et al, 2010). Dos casos onde os agentes etiológicos foram identificados nos surtos alimentares de 2000 a outubro de 2011, *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais envolvido, estando presente em 800 surtos (ANVISA, 2011).

### **1.3. Considerações gerais sobre *Staphylococcus coagulase positiva***

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada por Ogoston em 1980 (apud Levy,1997) que descreveu estes microrganismos como cocos em forma de cachos e responsáveis por infecções piogênicas. As primeiras espécies foram discriminadas através da produção de pigmentos: *S. aureus*, de cor amarelo-dourado e *S. albus* com colônias brancas. Em 1994, Baird Parker (apud Levy, 1997) reconheceu apenas três espécies de importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva – *S. aureus*; b) coagulase-negativa – *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.

Atualmente são descritas 32 espécies de estafilococos, das quais são capazes de produzir uma enzima extracelular, a coagulase, que coagula o plasma sanguíneo que é muito utilizado na rotina laboratorial. Entre estas espécies, denominadas de estafilococos coagulase positiva (ECP), *Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica; entretanto *S. intermidis* e *S. hyicus* também podem produzir enterotoxinas e já foram descritas em surtos (SILVA; GANDRA, 2004).

Por muitos anos *S. aureus* foi considerado a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como de produzir coagulase, posteriormente outras espécies relacionadas a surtos de intoxicação alimentar foram identificadas e em função deste fator houve mudança na legislação brasileira que passou a estabelecer a pesquisa e quantificação de estafilococos coagulase positiva ao invés da enumeração de *S. aureus* (SILVA; GANDRA, 2004).

De acordo com a Resolução RDC número 12 de 02 de Janeiro de 2001, item 8B, inciso F da ANVISA, os padrões microbiológicos de *Staphylococcus coagulase*

positiva, para queijos, variam de acordo com o grau de umidade do produto, com valores de aceitabilidade entre  $10^2$  UFC/g a  $5 \times 10^2$  UFC/g (BRASIL 2001)

O gênero *Staphylococcus* é composto por 15 subespécies (KLOOS; BANNERMAN, 1999). As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 $\mu$ m, não esporulados, capsulados ou não, anaeróbicos facultativos. Ao microscópio aparecem em forma de cachos de uva, crescem em temperatura de 7 a 48° C, sendo o ótimo de Crescimento entre 35 e 37°C. O pH ótimo para seu desenvolvimento encontra-se na faixa de 6,0 a 7,0, embora cresçam em níveis de pH que variam de 4,0 a 9,8. Possuem tolerância a concentrações de NaCl de 10 a 20%, com o tempo de geração de 30 minutos em média. Produzem várias toxinas, sendo estas pré-formadas no alimento. A produção de toxinas atinge o seu auge em temperaturas entre 40°C e 45°C, sendo ínfima em pH abaixo de 6,0 (SANTOS; HOFFMANN, 2010; VILELA et al., 2001; FREITAS; MAGALHÃES, 1990). Segundo Franco e Landgraf (2002) além da resistência a concentrações de 10 a 20% de NaCl, são resistentes a mesma concentração de nitratos e a têm capacidade de crescer a atividade de água (Aa) de 0,86, apesar de, sob condições idéias, poderem se desencadear em valores de Aa de até 0,83, sem no entanto, produzir enterotoxinas.

Segundo Silva e Gandra (2004) a maior parte das espécies de *Staphylococcus* apresenta metabolismo respiratório e fermentativo e têm capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos, principalmente em condições de aerobiose, com produção final de ácido, mas não de gás.

Seu repertório de genes permite responder positivamente a ambientes adversos, possibilitando assim, sua invasão, sobrevivência e multiplicação em diferentes sítios do hospedeiro (LOWY, 2003; JORDENS et al., 1989). Os *S. aureus* podem expressar diversos fatores de virulência que lhes conferem capacidade de rápida colonização (KONEMAN et al. 2001).

Os estafilococos são encontrados no meio ambiente e colonizam a pele, períneo, axilas, vagina e outros sítios do corpo e animais, estimando-se que esteja presente nas fossas nasais de 20% a 40% de humanos adultos saudáveis, assim os manipuladores de alimentos podem tornar-se portadores assintomáticos (BARROS et al., 2004).

As infecções agudas causadas por estafilococos podem ser localizadas como pústulas, furúnculos, impetigos ou processos mais extensos e graves, como infecção cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, etc., ou disseminadas, como septicemia. Doenças causadas por toxinas de estafilococos apresentam, também, amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque e intoxicação alimentar (ALMEIDA, 2004; ARBUTHNOTT; COLEMAN, AZEVEDO, 1990).

Os estafilococos são causadores de toxinoses alimentares podendo produzir doença tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla pelos tecidos, como pela produção de enterotoxina, que é uma causa importante de intoxicação alimentar, sendo produzida, principalmente, quando cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em alimentos contendo carboidratos e proteínas (CERESER et al., 2011; FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processos moderados de temperatura, as enterotoxinas são termoestáveis e resistentes a temperaturas normalmente utilizadas no processamento de produtos lácteos (CERESER et al., 2011; FREITAS; MAGALHÃES, 1990).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* secretam várias toxinas (enterotoxinas) e enzimas que são responsáveis por uma diversidade de patologias, em humanos. Segundo Novack (1999), podem ser didaticamente divididas em infecções e intoxicações.

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares com baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons), hidrossolúveis, cuja composição de aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas são semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas. Não são inativadas por enzimas proteolíticas, característica que explica a capacidade de permanecerem ativas após a ingestão, bem como certos alimentos, resistindo a ação de enzimas produzidas por outros microrganismos e a enzimas do próprio alimento (SANTOS; HOFFMANN, 2010; NOVAK, 1999; SILVA, 1998; MARTINS; MYERS, 1994; LEBEAU et al., 1994; LOPES, 1990).

Segundo Bergdoll (1990), Silva (1998), e Coelho e colaboradores (2007), a enterotoxina mais freqüentemente encontrada em surtos de toxinfecções alimentares é a EEA, sendo que a EEC EEB, EED e EEE respectivamente, possuem baixa incidência em surtos de toxinoses.

A multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxina dependem das características físicas, químicas e microbiológicas de cada tipo de queijo, sendo os queijos moles mais favoráveis a formação de enterotoxinas (MEYRAND; VERNOSZY-ROZAND, 1999).

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem em média, quatro horas após a ingestão do alimento podendo variar entre 1 a 6 horas, geralmente duram entre 24 a 48 horas e o índice de mortalidade pela doença é muito baixo. Os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais graves em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas de doenças crônicas imunossupressoras (SILVA; GANDRA, 2004).

Enzimas como a catalase, termonuclease e a coagulase, são produzidas pelas espécies de estafilococos, sendo responsáveis por fatores de virulência. As enzimas são utilizadas para identificação laboratorial dos estafilococos. A catalase atua inativando peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. (SILVA; GANDRA, 2004). Segundo Fung et al. (2001), a presença da catalase aumenta a sobrevivência da bactéria no interior dos fagócitos polimorfonucleares.

A termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase) é uma fosfodiesterase com propriedades endo e exonucleotídica (FUNG et al. 2001). Essas enzimas que podem clivar DNA e RNA para formar 3'fosfonucleotídeos, é produzida pela maioria das cepas de *Staphylococcus*. Estruturalmente é uma proteína globular compacta consistindo de uma cadeia polipeptídica podendo ser isolada na superfície celular ou próxima dessa. O aquecimento a 65°C altera a estrutura, mas essas mudanças podem ser rapidamente e completamente reversíveis, sua presença em alimentos é usada como uma medida indireta do crescimento de *S. aureus* podendo, também, indicar a presença potencial de enterotoxinas (COELHO et al., 2007; KLOOS; BANNERMAN, 1999; HUI et al., 1994).

Com relação a coagulase extracelular, sete diferentes tipos antigênicos têm sido descritos, entretanto, sua única função na patogenicidade bacteriana parece ser a formação de coágulos a fim de inibir a fagocitose, algumas espécies de estafilococos apresentam dois tipos de coagulase: coagulase livre, uma enzima extracelular que catalisa a reação entre uma substância presente no plasma, denominada de “fator de reação de coagulase (CRF)” e o fibrinogênio, formando

fibrina e a coagulase ligada, presente na superfície da parede celular bacteriana, que reage diferentemente com o fibrinogênio presente no plasma, produzindo uma rápida aglutinação das células bacterianas. Tanto a coagulase livre quanto a ligada podem recobrir as células bacterianas com fibrina e torná-las resistentes a opsonização e a fagocitose, diminuindo a concentração de fibrinogênio no sangue circulante (KLOOS; BANNERMAN, 1999; MARQUES; MARTINS; NETO, 2006).

A colonização do *S. aureus* e a subsequente infecção está relacionada a múltipla resistência aos antibióticos usualmente disponíveis no comércio, o *S. aureus* pode expressar diversos fatores de virulência que lhes conferem capacidade de rápida colonização e, encontrando condições apropriadas, pode ocorrer sua disseminação através dos diversos tecidos e órgãos do hospedeiro (BERGER-BAACHI, 1994).

Analisando a estrutura morfofisiológica do *S. aureus* entende-se que a cápsula polissacarídica, quando presente, impede a fagocitose opsônica, enquanto o peptidoglicano está envolvido na resposta inflamatória do hospedeiro contra infecções estafilocócicas, pela ativação da via alternativa do sistema complemento. Um outro componente da parede celular, o ácido teicóico, parece estar envolvido com a ativação do sistema complemento e com possível aderência desses microorganismos a mucosa do hospedeiro (LEE et al., 1997).

Do ponto de vista clínico, a espécie bacteriana (*S. aureus*), tornou-se uma das mais importantes, tendo sido descrita como agente de infecção hospitalar entre as décadas de 50 e 60, particularmente, em função da resistência penicilina. Poucas semanas após o lançamento da meticilina, que ocorreu em 1961, foram identificadas cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a essa droga (MRSA) na Inglaterra (ROBINSON; ENRIGHT, 2003; JEOVONS, 1961).

Segundo Levy (1997), as cepas de *S. aureus* multi-resistentes são comuns nos hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas apenas aos antibióticos vancomicina e teicoplanina.

Neste sentido, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria que representa um grande risco à Saúde Pública, devido à sua resistência à antibioticoterapia, fatores de virulência e produção de enterotoxinas, se tornando assim um problema global e extremamente sério.

Justifica-se desta forma, a necessidade de levantamentos sobre a veiculação de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, presentes em Queijos Minas

Frescais artesanais, resistentes a antibióticos usualmente utilizados na microbiológica clínica, uma vez que a matéria-prima utilizada na sua elaboração, os processos produtivos utilizados, e seu largo consumo pode gerar sérios agravos a saúde dos consumidores.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

Avaliar a qualidade microbiológica dos Queijos Minas Frescais artesanais, comercializados na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto-Paranaíba do Estado de Minas Gerais, através da determinação e quantificação da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, e determinação fenotípica da resistência destes micro-organismos a antimicrobianos específicos.

### **2.2 – Objetivos específicos**

- Coletar Queijo Minas Frescal na mesorregião do Região do Triângulo Mineiro e Alto-Paranaíba;
- Quantificar a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em Queijo Minas Frescal artesanal;
- Identificar cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva em Queijo Minas Frescal artesanal, resistentes a antibióticos específicos;
- Fornecer dados epidemiológicos para o programa de monitoramento de alimentos da Vigilância Sanitária (PROGVISA), do Estado de Minas Gerais;

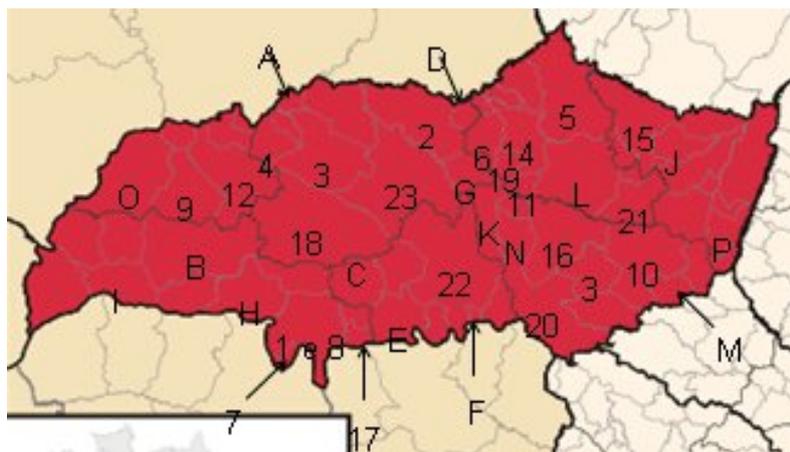
### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Neste trabalho, por meio de um estudo descritivo prospectivo, foi feita avaliação de 117 amostras de Queijo Minas Frescal artesanal adquiridas em diferentes pontos de venda em 38 cidades e um distrito, escolhidos ao acaso, na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto-Paranaíba – MG, conforme mostra a Figura 1. O número de amostras por localidade variou de acordo com a disponibilidade das mesmas no ato da coleta, com no mínimo um e no máximo cinco.

As amostras foram adquiridas no período de agosto de 2009 a dezembro de 2011, constituída de amostra indicativa (amostra única / peça inteira, sem cortes com peso mínimo de 500 gramas). As amostras foram condicionadas em sacos plásticos estéreis, devidamente identificados e lacrados. O transporte foi realizado em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LCQS/FAMEV/UFU), ou ao Laboratório de Controle de Qualidade em Saúde – Vigilância Sanitária Municipal de Uberlândia MG (LCQS-VISA/PMU). O tempo total entre a coleta e o início das análises não foi superior a 24 horas. Sempre respeitando a temperatura de refrigeração durante o acondicionamento. Todas as análises microbiológicas ocorreram segundo Silva et al 2007.

As amostras coletadas foram correlacionadas com os limites de aceitabilidade propostos para *Staphylococcus* coagulase positiva, em legislação específica - padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº12, de 2 de Janeiro de 2001 (D.O.U. de 10/01/2001 Seção 1 p. 45 a 53) – Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA/MS), anexo I, Item 8B, inciso F - queijos de alta umidade: umidade de 55% (BRASIL 2001).



**Figura 2:** Locais de Coleta na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba  
 Fonte: Mapa adaptado pelo autor.

**Legenda:**

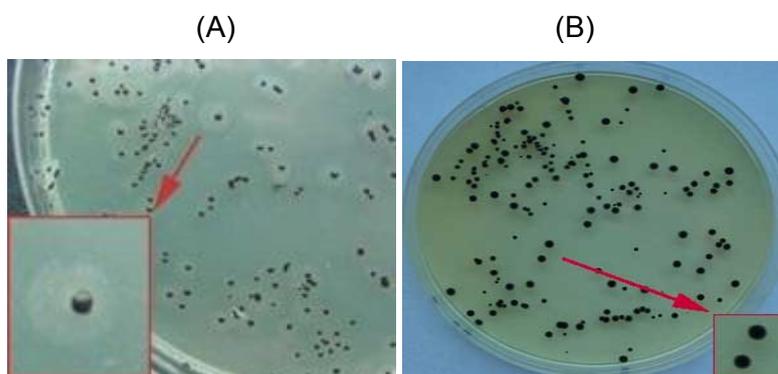
Cidades com Amostras Contaminadas		Cidades com Amostras sem Contaminação	
Código	CIDADE	Código	CIDADE
1	Aparecida de Minas (*)	A	Araporã
2	Araguari	B	Campina Verde
3	Araxá	C	Campo Florido
4	Canápolis	D	Cascalho Rico
5	Coromandel	E	Conceição das Alagoas
6	Estrela do Sul	F	Delta
7	Fronteira	G	Indianópolis
8	Frutal	H	Itapajipe
9	Guriatã	I	Iturama
10	Ibiá	J	Lagoa Formosa
11	Irai de Minas	K	Nova Ponte
12	Ituiutaba	L	Patrocínio
13	Monte Alegre	M	Pratinha
14	Monte Carmelo	N	Santa Juliana
15	Patos de Minas	O	Santa Vitória
16	Perdizes	P	São Gotardo
17	Planura		
18	Prata		
19	Romaria		
20	Sacramento		
21	Serra do Salitre		
22	Uberaba		
23	Uberlândia		

### 3.2. Preparo das Amostras / Contagem direta em placas de *Staphylococcus* sp.

De maneira asséptica as amostras foram retiradas das embalagens secundárias e/ou primárias, por quarteramento as amostras foram pesadas - 25 g, em saco plástico estéril, com posterior adição de 225 mL de água peptonada a 0,1% constituindo assim a diluição de seriada de  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, foi realizada a diluição seriada de  $10^{-2}$ , ou seja, transferiu-se para tubo de ensaio contendo 9 mL do mesmo diluente, 1 ml da diluição preparada  $10^{-1}$ , e assim sucessivamente até alcançar a diluição seriada de  $10^{-4}$ . De cada diluição foram inoculadas e espalhadas, com auxílio de alça de Drigalsky, 0,1mL em superfície de placas contendo Agar Baird Parker (Ágar seletivo para isolamento de *Staphylococcus* sp em alimentos) previamente preparadas e secas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 – 44h.

Decorridos o tempo necessário, verificou-se a presença de colônias típicas, com máximo 1,5mm de diâmetro, lisas convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por um halo transparente estendendo para além da zona opaca, e colônias atípicas, colônias cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos de *Staphylococcus* (Figura 2).

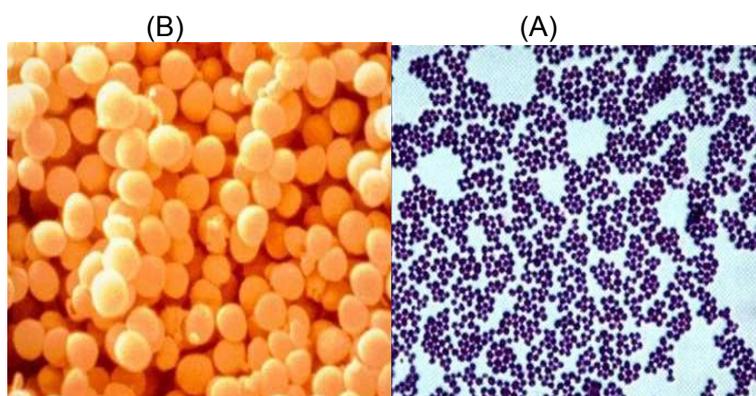
O resultado foi obtido, pelo cálculo do número de UFC/g em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas. Para confirmação foi realizado coloração de Gram e o teste da coagulase.



**Figura 3:** colônias típicas (A) e atípicas (B) de crescimento de *Staphylococcus* sp em Ágar Baird Parker.  
Fonte: Adaptado pelo autor (amostra (A) UDI 114 / (B) SER 110)

### 3.2.1. Coloração de Gram

Foram coradas lâminas de cada placa onde houve crescimento de colônias típicas e atípicas. As colônias foram espalhadas nas lâminas, acrescentado uma gota de solução salina a 0,9% para melhor distribuição, fazendo esfregaço em chama direta. Posteriormente procedeu-se a coloração propriamente dita, conforme método de Gram, e, observação em Microscópio Ótico - lente de imersão. O resultado esperado foi a presença de cocos Gram positivos, arranjados em forma de estafilococos. Conforme Figura 3.



**Figura 4-** Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp.  
Fonte: Science Photo Library (2007) e Tortora, Funke e Case (2005).

### 3.2.2. Provas Bioquímicas

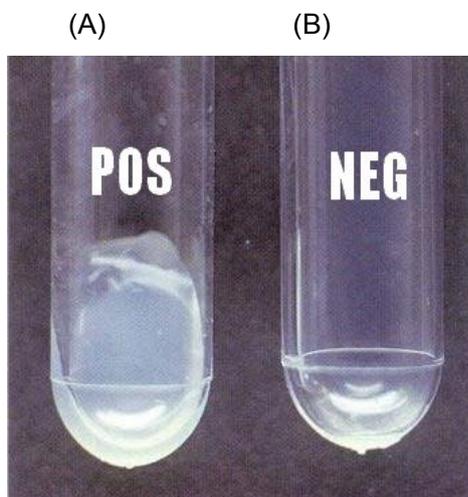
- Inoculação em tubos contendo BHI

A partir de cada placa selecionada foram colhidas 5 (cinco) colônias típicas e atípicas e semeadas em tubos estéreis contendo 0,2mL de caldo BHI. Os tubos, devidamente identificados, foram incubados em Banho-Maria a 37°C por 24h.

- Pesquisa da presença de coagulase

Após a incubação em BHI, por 24h, houve a adição, a cada tubo com o inoculo, 0,2mL de plasma de coelho, com posterior incubação por mais 24h em Banho-Maria

a 37°C. Os tubos considerados positivos serão aqueles em que apresentarem coágulo evidente (Figura 4).



**Figura 5:** Teste de coagulase para *Staphylococcus* coagulase positiva (A) e *Staphylococcus* coagulase negativa (B)  
Fonte: <http://www.biomedicinapadrao>. Acesso em 30/09/2012

- Armazenagem dos isolados selecionados

Os isolados confirmados de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram inoculadas em tubos contendo 05 mL de caldo BHI, e incubados em estufa a 37°C, por 24 h, até atingirem a concentração de  $10^8$  UFC/mL, utilizando como referência a escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland. Posteriormente foram transferidos 200 µL de inóculo para microtubos estéreis, com adição de 200 µL de glicerol estéril. Cada microtubo foi identificado conforme anexo I – Quadro I. Todas as cepas isoladas e armazenadas nos microtubos foram congeladas em ultra-freezer a – 80°C.

### 3.4. Teste de sensibilidade antimicrobiana

Após a identificação e quantificação do *Staphylococcus* coagulase positiva, e congelamento dos isolados, os mesmos (Julho 2012) foram descongelados, a temperatura ambiente, e cultivadas em ágar sangue, com realização da prova de catalase. Esse procedimento teve como objetivo direcionar as cepas injuriadas pelo congelamento, ao seu estado de competência normal, possibilitando seu adequado crescimento nos meios utilizados na detecção da resistência aos antimicrobianos.

As cepas novamente isoladas foram repicadas em tubos contendo 05 mL de caldo BHI estéril, incubados em estufa a 37°C, por 24 h até atingirem a concentração de 10<sup>8</sup>UFC/mL, utilizando como referência a escala de turbidez 0,5 da escala de McFarland.

No Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, as cepas foram cultivadas em placas contendo Agar Mueller-Hinton (MHA), contendo os discos de antimicrobianos: beta-lactâmicos: penicilina, oxacilina, e antibióticos da classe dos glicopeptídios: vancomicina e teicoplanina, sendo as placas mantidas a 37°C por 12 a 24 horas. A interpretação dos resultados foi baseada na presença de halo de inibição produzido ao redor de cada disco sendo as amostras classificadas como sensível ou resistente, segundo a tabela de halos padronizada pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards* 2010).

## 4- RESULTADOS

### 4.1. Verificação da viabilidade e pureza de *Staphylococcus coagulase positiva*

Nas análises microbiológicas de 117 amostras, de Queijo Minas Frescal artesanal, houve identificação de *Staphylococcus coagulase positiva*, em 65 amostras (55,55%). Das 65 confirmações, 42 amostras (35,89%) tiveram contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* abaixo de  $5 \times 10^2$  UFC/g. As outras 23 amostras (19,67%), se apresentaram impróprias para consumo humano, com resultados acima de limite tolerado pela legislação, ou seja, valores superiores a  $5 \times 10^2$  UFC/g. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Nas demais 52 amostras (44,44%), proveniente de 16 cidades, não apresentaram contaminantes nos meios de cultivo utilizados no presente estudo, ou não responderam positivamente as provas laboratoriais de coagulase utilizada na identificação do microrganismo em questão, apresentando outras contaminações (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 1:** Valores mínimo e máximo de contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, abaixo e acima do limite tolerado pela legislação brasileira, por cidade.

CIDADES/MG	N. de amostras coletadas	N. de amostras com presença de S. coagulase+ abaixo do limite estabelecido	N. de amostras com presença de S. coagulase + acima do limite estabelecido > 5X10 <sup>2</sup> UFC/g	Valor máximo encontrado (> 10 UFC/g e <5X10 <sup>2</sup> UFC/g)	Valor mínimo encontrado
Aparecida de Minas	04	03	01	3x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Araguari	04	02	02	2,5x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Araxá	04	03		1,5x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Canápolis	02	01	01	4,8x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Coromandel	03	03	01	3,4x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Estrela do Sul	03	02	01	1,3x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Fronteira	04	02	02	1,6x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Guriatã	02	01		3,6x10 UFC/g	
Ibiá	03	01	01	3x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Irai de Minas	02	01	01	3x10 UFC/g	
Ituiutaba	04	02	01	2,1x10 <sup>2</sup> UFC/g	<10UFC/g
Monte alegre	04	03	01	3,4x10 <sup>3</sup> UFC/g	
Monte Carmelo	03	02	02	1,8x10 UFC/g	
Patos de Minas	02	01		5x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Perdizes	02	01	01	3,5x10 <sup>3</sup> UFC/g	
Planura	01	01	02	1,3x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Prata	03	02		4,6x10 UFC/g	
Romaria	02	02	01	7,8x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Sacramento	03	02	01	3,4x10 <sup>2</sup> UFC/g	
Serra do Salitre	02	02	01	1,4x10 UFC/g	
Uberaba	03	02	01	1,7x10 UFC/g	
Uberlândia	04	03	01	3,7x10 <sup>3</sup> UFC/g	

**Tabela 2:** Relação de cidades onde as amostras coletadas não evidenciaram contaminação por *Staphylococcus coagulase positiva*.

CIDADES/MG	Número de amostras coletadas	Resultado (*)
Araporã	04	<10UFC/g
Campina Verde	03	
Campo Florido	03	
Cascalho rico	04	
Conceição das Alagoas	03	
Delta	02	
Indianópolis	02	
Itapajipe	03	
Iturama	04	
Lagoa Formosa	04	
Nova Ponte	05	
Patrocínio	03	
Pratinha	03	
Santa Juliana	03	
P Santa Vitória	03	
São Gotardo	03	

(\*) Amostras sem evidência de contaminação por *Staphylococcus coagulase positiva*

**Tabela 3:** Relação geral de resultados obtidos, e outros contaminantes

Total de amostras	Contaminante	%
52	Outros contaminantes (*) ou Ausência de contaminantes	44,44
42	Amostras contaminadas /aprovadas	35,90
23	Amostras contaminadas/condenadas	19,66
Total 117		100

(\*) *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus capitis*; *Staphylococcus sp*; *Enterococcus sp*.

## 4.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

As cepas provenientes dos isolados obtidos das amostras Queijo Minas Frescal, por cidade, foram codificadas, conforme Quadro I (Anexo I). As cepas foram codificadas levando em consideração a cidade e a numeração da amostra analisada, ou seja, Primeiramente as iniciais das cidades, posteriormente a numeração das amostras.

Verificou-se que das 65 amostras com presença confirmada de *Staphylococcus* coagulase positiva, 50 amostras (76,92%) apresentaram perfil de sensibilidade a todos os antibióticos testados (beta-lactâmicos - Cefaloxina, Oxacilina, Penicilina) e aos grupos de glicopeptídios (Vancomicina e Teicoplanina). Apenas 15 amostras (23,08%), se mostraram resistentes a Penicilina, apesar de sensíveis aos demais antibióticos testados. Nas amostras analisadas não foram encontradas *Staphylococcus* coagulase positiva multi-resistentes.

Os resultados encontrados nos testes de suscetibilidade aos antibióticos, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Suscetibilidade aos antimicrobianos (Cefaloxina, Oxacilina, Penicilina, Vancomicina, Teicoplanina) dos isolados de *Staphylococcus coagulase positiva*, obtidos das amostras analisadas.

CEPAS (*)	ANTIMICROBIANOS				
	PEN	OXA	CEF	VAN	TEI
APA (1) (4)	R	S	S	S	S
ARA (7)	R	S	S	S	S
FRO (40) (41)	R	S	S	S	S
FRU (45)	R	S	S	S	S
MON (70) (72) (73)	R	S	S	S	S
PAT (83)	R	S	S	S	S
PRA (91)	R	S	S	S	S
ROM (97)	R	S	S	S	S
UBA (112)	R	S	S	S	S
UDI (114) (116)	R	S	S	S	S
ARP	S	S	S	S	S
ARX	S	S	S	S	S
CAM	S	S	S	S	S
CAP	S	S	S	S	S
CAN	S	S	S	S	S
CAS	S	S	S	S	S
COM	S	S	S	S	S
COR	S	S	S	S	S
DEL	S	S	S	S	S
EST	S	S	S	S	S
GUR	S	S	S	S	S
IBI	S	S	S	S	S
IND	S	S	S	S	S
IRA	S	S	S	S	S
ITA	S	S	S	S	S
ITU	S	S	S	S	S
ITR	S	S	S	S	S
LAG	S	S	S	S	S
MOC	S	S	S	S	S
NOV	S	S	S	S	S
PAR	S	S	S	S	S
PER	S	S	S	S	S
PLA	S	S	S	S	S
PRT	S	S	S	S	S
SAC	S	S	S	S	S
SAN	S	S	S	S	S
SAV	S	S	S	S	S
SOG	S	S	S	S	S
SER	S	S	S	S	S

Abreviações para antimicrobianos: Penicilina, OXA-oxacilina, CEF-celaloxina, VAN-vancomicina, TEI-teicoplanina. Suscetibilidade: S - isolados sensíveis, R- isolados resistentes ao antimicrobiano testado.

(\*) Numeração das amostras com perfil de resistência a penicilina.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados verificados referentes a presença e a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva em Queijos Minas frescais no presente trabalho estão de acordo com pesquisas realizadas, contudo, em universos amostrais, localidades e períodos diferenciados, havendo variações dependendo da localidade e do universo amostral, conforme descrição abaixo.

No ano de 1998, Reibnitz e colaboradores em Blumenau – SC, analisou 20 amostras de queijos encontrando 95% com presença de *Staphylococcus* coagulase positiva.

A alta frequência de *S. aureus* nas amostras de queijos frescais pode ser atribuída à contaminação do leite cru, a recontaminação pós-pasteurização, a condições de armazenamento inadequadas e ao manipulador, o qual tem sido considerado uma importante fonte de disseminação dessa bactéria em alimentos. É importante ressaltar que *S. aureus* tem sido a principal espécie envolvida em casos de surtos de intoxicação alimentar, devido à produção de enterotoxinas estafilocócicas.

Observa-se, em queijos frescos, houve alta frequência de *Staphylococcus* coagulase negativa, o que pode ser considerado preocupante, visto que esse grupo de micro-organismos, apesar de produzirem quantidades menores de enterotoxinas quando comparados com *S. aureus*, não deve ser excluído da investigação quando da ocorrência em surtos de intoxicações alimentares, uma vez que este grupo de micro-organismos tem grande relevância em infecções hospitalares, podendo ser veiculados por alimentos.

Picoli e colaboradores (2006), pesquisando em laticínios de queijo frescal de leite de cabra, observam a qualidade dos produtos lácteos. Apontam *S. aureus* como principal produtor de toxinas, levando a toxinfecção alimentar, tais bactérias podem ser introduzidas nos alimentos sobre várias formas, entre elas o ato de manipular o alimento, levar a mão à boca e ao nariz, assim como lesões estafilocócicas presentes na pele de manipuladores diretos.

Rocha, Buriti e Saad em 2006, avaliando a evolução da contaminação microbiana de Queijo-de-Minas Frescal durante sua vida de prateleira, em sete marcas, em supermercados na cidade de São Paulo, verificou contagens elevadas de *Staphylococcus* spp. Também em 2006, Salotti, avaliando 30 amostras de Queijo

Minas Frescal em Jaboticabal – SP, encontrou presença de *Staphylococcus aureus*, em 20% das amostras, com valores variando entre  $5 \times 10^3$  UFC/g a  $> 5 \times 10^4$  UFC/g.

Em Uberlândia–MG, Rezende e colaboradores 2010; Komatsu e colaboradores 2010 ao avaliar amostras Queijos Frescais, verificaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC.g) com contagens elevadas, impróprias para consumo humano. Na mesma cidade em 2011, Ferreira et al, encontrou 90% de amostras contaminadas, em feiras livres.

Em relação aos testes de suscetibilidade a antimicrobianos, pode se observar resultados semelhantes de acordo com vários estudos que objetivaram determinar o padrão de sensibilidade de *Staphylococcus* coagulase positiva a diferentes antibióticos. Verificando padrões variáveis de resistência e sensibilidade (PINTO; SERQUEIRA, 2001; ANDRÉ et al, 2006.; COSTA, 2010.; FRANCO et al, 2011.; JUNIOR et al 2011)

Os testes de suscetibilidade a antimicrobianos passaram a receber maior destaque a partir do final da década de 80, devido a ocorrência de surtos graves de infecções hospitalares em berçários e unidades de terapia intensiva. Esses micro-organismos são considerados até hoje, um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecção hospitalar, ocupando o primeiro lugar nesse tipo de infecção associada a dispositivos invasivos em leitos de CTI, com resistência aos beta-lactâmicos da ordem de 60% (MORENO et al., 2006).

Borges e colaboradores, 2008, ao analisar o índice de contaminação por *Staphylococcus* sp em uma linha de produção de queijo coalho, em Santa Maria, RS, encontrou 20% de contaminação do total de 68 amostras analisadas, 12 foram positivas, dentre elas 3 *Staphylococcus* coagulase positiva e 9 *Staphylococcus* coagulase negativa. A prevalência de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, com potencial enterotoxigênico nas amostras da linha de produção de queijo de coalho, pode representar um risco em potencial de produção de enterotoxinas no produto final, sob condições adequadas de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, atividade de água e concentração de cloreto de sódio.

O presente trabalho analisou amostras coletadas nos anos de 2009 a 2011, apresentando resultados que demonstram a fragilidade na produção higiênica-sanitária satisfatória de Queijo Minas frescal, pois constata-se a frequente contaminação desse produto, quando comparado a outros estudos semelhantes.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apontam para dados preocupantes, a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras representa ausência de um efetivo controle de qualidade na matéria-prima e falta de higiene, principalmente dos manipuladores de alimentos, uma vez que bactérias do gênero *Staphylococcus*, além de serem microrganismos patogênicos, são considerados indicadores.

Os Estafilococos são um grupo de bactérias encontradas em um largo espectro de doenças, contudo sua mera identificação e quantificação, representada pela presença de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, não indica que este grupo de micro-organismos seja o único responsável por surtos de intoxicação alimentar, sendo necessários estudos moleculares complementares e identificação de amostras produtoras de enterotoxinas e com presença de *Staphylococcus* coagulase negativa, uma vez que verificou-se número significativo de amostras com presença de *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus capiti*, pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa, que também são preocupantes para Saúde Pública.

A exigência de pasteurização do leite para a fabricação do produto evitaria em muitos casos contaminações microbiológicas pelos agentes descritos nesse estudo, contudo há a argumentação que a ausência dos “fermentos naturais” alterariam o sabor próprio do queijo, portanto faz-se necessário implementação de políticas públicas objetivando treinamento, uso de tecnologias apropriadas e maior acompanhamento da agroindústria familiar na produção artesanal de Queijos.

Recomenda-se que a presença de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa não sejam ignoradas em investigações de casos suspeitos de intoxicação estafilocócica, uma vez que este grupo de patógenos, estando presente no alimento, oferece risco de causar intoxicação ao consumidor. Sendo necessário a revisão da legislação que determina os padrões microbiológicos para alimentos (RDC 12/2001), inserindo limites de aceitabilidade para bactérias pertencentes ao grupo do estafilococos coagulase negativa.

## 7- REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e Coliformes Fecais. **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n.111, p. 79-85. 2003.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES L. J.; SERAFINI, Á. 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. V.43 supl.São Paulo, 2006
- ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C.; AZAVEDO, J. S. Staphylococcus toxins in human disease. **J. Appl Bacteriol**, v. 19, p. 101-107, 1990.
- ALTEKRUSE, S. F.; TIMBO, B. B.; MOWBRAY, J. C.; BEAN, N. H.; POTTER, M. E. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 709-725, 1998.
- BARROS, P. C. O. G.; NOGUEIRA, L. C.; RODRIGUEZ, E. M.; CHIAPPINI, C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.1 8, n. 122, p. 32-37, julho, 2004.
- BEHMER, M. L. A.. **Tecnologia do Leite**. Nobel, São Paulo, 13º Ed., p. 155-156, 1999.
- BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: Dean, C. Foodborne diseases. San Diego, 4ª ed., **Academic Press**, p.85-106, 1999.
- BERGUER-BÄCHI, B. Expression of resistance of methicillin. **Trends Microbiol** v. 10, p. 389-393, 1994.
- BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Contamination profile for *staphylococci* and its enterotoxins and monitorization of the conditions of hygiene in a 'coalho' cheese production line. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1431-1438, 2008.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº62 de 26 de agosto de 2003**. Diário Oficial da União, Brasília, setembro, 2003. p. 14 – 51. Seção 1.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário oficial da república Federativa do Brasil, Brasília 10 de janeiro de 2001.

BUAINAIN, A.M. **Agricultura familiar e o novo mundo rural.** *Sociologias*, Porto Alegre, v.5, n.10, p.312-314, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-45222003000200011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-45222003000200011&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 22 jul. 2011.

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

CASTELÕES, Liliane. Políticas públicas: proteção e emancipação. **Agricultura familiar predomina no Brasil.** 2005. Disponível em [www.comciencia.br](http://www.comciencia.br). Acesso em Janeiro de 2013.

CERESER, N. D.; ROSSI JUNIOR, O. D.; MARCHI, P. G. F.; SOUZA, V.; CARDOZO, M. V.; MARTINELLI, T. M. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. *Ci Anim. Bras.*, Goiânia, v. 12, n 1, p. 149-155, jan./mar. 2011.

COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. de. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciência Rural*, V. 37, N. 1, janeiro-fevereiro, 2007.

COSTA, J. C. B. **Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal.** Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2010. xiv, 73 f.

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

EMBRAPA GADO DE LEITE, 2009. **Produção brasileira de queijo.** Disponível em: <http://www.cnpqi.embrapa.br>. Acesso: 28/05/2011

EMBRAPA 2012 Elaboração: R.ZOCCAL - **Embrapa Gado de Leite.** Disponível em: <http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0242.php> acesso em 01/10/2012 Acesso: 09/10/2012

FERREIRA, R.M., SPINI, J.C.M., CARRAZZA, L.G., ANT´ANA, D. S., OLIVEIRA, M. T., ALVES, L.R.C., GOMES, T. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 5, Ed. 152, Art. 1021, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** Editora Atheneu. São Paulo, 2ª Ed., 184p, 2002.

FRANCO, R.M., SILVA, L.A.V., BASTOS, P.B., BOECHAT, J.U. Perfil de sensibilidade microbiana de cepas de Staphylococcus coagulase positiva oriundas de queijo minas frescal na região noroeste fluminense. Colégio Técnico Agrícola Ildfonso Bastos Borges (CTAIBB) / Universidade Federal Fluminense - Bom Jesus do Itabapoana, RJ. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v.25, n.196/197, ano 2011, p.105-106

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Food microbiology**. Mc Graw-Hill, New Yourk, 4<sup>a</sup> ed., 494p., 1988.

FREITAS, M. A.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de Staphylococcus aureus isolados de vacas com mastite. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 15-19, 1990.

FUNG, C. P.; HO, M. W.; WANG, F. D.; TSAI, K.; LIU, C. E.; LIU, C. Y. Investigation of outbreak caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a cardiovascular surgery unit by ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis. **APMIS**, v. 109, p. 474-480, 2001.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Edição Revisada e Ampliada. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005. 200 p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene na e Vigilância Sanitária de Alimentos: Qualidade das matérias primas, Doenças Transmitidas por Alimentos e Treinamento de Recursos Humanos**. 3. Ed. São Paulo, Manole, 2008, 986p.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene na Ordenha. Higiene e Vigilância Sanitária dos alimentos**. Livraria Varela, São Paulo, v. 4, p. 80-89, 2001.

GOMES, Êzio José, **Dados do Censo Agropecuário Confirmam Concentração da Atividade Leiteira no Brasil**. Departamento de Estudos Sócio-econômicos rurais, Curitiba, 2009

HASTARD, O.M.; HAUG, A.; HOSTMARK, A.T. Bovine milk in human nutrition--a review. **Lipids Health Dis**. V. 25, p. 6-25.

HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacterias. **Marcel Decker Inc.**, New York 613p, 1994.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Characteristics of microbial pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. 513p.

JEOVONS, M. P. "Celbenin" - resistant staphylococci. **Br. Med. J.** v. 1, p. 124-125, 1961.

JORDENS, J. Z.; DUCKWORTH, J.; WILLIAMS, R. J. Production of “virulence factors” by epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. **J. Med. Microbiol.** V. 30, p. 245-252, 1989.

JUNIOR, L. D. P. M.; TREVISAN, A. B.; ANDRADE, S. S.; MACEDO V.P.; MELO, M. B. P. C.; COSTA, N. P.; COSTA, W. L. R.; PINNA, M. H.; SILVA, M. C. A. **Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *staphylococcus coagulase* positiva isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica em fazendas da Bahia.** Escola de Medicina Veterinária – UFBA, 2011. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/167.pdf> Acessado em: 09/10/2012.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R. *et al. Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society of Microbiology, 7<sup>a</sup> ed., p. 264-282, 1999.

KOMATSU, R.S., RODRIGUES, M.A.M., LORENO, W.B.N., SANTOS, K.A. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva em queijo minas frescal produzidos em Uberlândia MG. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 26, n. 2, p. 316-321, Mar./Apr. 2010

KONEMAN, E. W. **Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. In: Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido.** KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; TENNANT, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. Medsi, Rio de Janeiro, 5<sup>o</sup> Ed., p. 795–865, 2001.

LEBEAU, C.; VANDENESH, F.; GREENLAND, T.; NOVICK, R. P.; ETIENNE, J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agar-dependent mechanism. **J. Bacteriol.**, v.176, p.5534-5536. 1994.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M. L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, v. 76, n. 2, p. 195-202, 2002.

LEE, Y. L.; CESÁRIO, T.; GUPTA, G.; FLIONS, L.; TRAN, C.; DECKER, M.; THRUPP, L. Surveillance of colonization and infection with *Staphylococcus aureus* susceptible or resistant to methicillin in a community skilled-nursing facility. **An. J infect Control**, v. 25, p. 321-321, 1997.

LEVY, C. E. Aspectos Microbiológicos. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇA, J. S.; AMARANTE, J. M. B.; FILHO, M. B. A.; GRINBAUM, R. S.; RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle.** Sarvier, São Paulo, p. 591-598, 1997.

LOPES, H. R. **Avaliação da produção de enterotoxinas estafilocócicas A, D e E.** Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 68p, 1990.

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

MACHADO, E. C. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, out./dez. 2004.

MARQUES, M. R. H.; MARTINS, R. P.; NETO, A. C. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n.140, p. 86-92, abril 2006.

MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. **Avaliação das características físico-químicas do queijo Minas frescal produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. Pirassununga: FZEA/USP, 2004. 15 p. (Iniciação Científica).

MARTIN, S. E.; MYERS, E. R. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y. H.; GORHAM, R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. **Foodborne disease handbook. Diseases caused by bacteria**. Marcel Decker, New York, p.345-394, 1994.

MORENO, C. A.; ROSENTHAL, V. D.; ORLATE, N.; GOMEZ, W. V.; SUSSMANN, O.; AGUDELO, J. Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of colombian hospitals: findings of the internacional nosocomial infection control consortium. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, p. 349-56, 2006.

MEYRAND, A.; VERNOSY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. **Revue Medicine Veterinaire**, v. 150, n. 7, p. 601-616, 1999.

NCCLS – **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**. M2-A5, 5ed., v.13, n.24, 2010

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

OLIVEIRA, G. A.; FARIA, J. B.; LEVYAND, D. E.; MAMIZUKA, E. M. Characterization of the brazilian endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from hospitals throughout Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 163-170, 2006.

PANETTA, J. C. Leite informal: existe solução. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 109, p. 3, jun. 2002.

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

PICOLI, S.U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.65-69, 2006.

PINTO, T. S.. **Caracterização fenotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de queijos ricota**. Universidade Federal da Paraíba UFPB/CCS 2001

PREZOTTO, L.L. Qualidade Ampla: referência para a pequena agroindústria rural inserida numa proposta de desenvolvimento regional descentralizado. In: LIMA, D.M.A.; WILKINSON, J. (Org.). **Inovações nas tradições da agricultura familiar**. Brasília: CNPq/Paralelo 15, 2002. p.285-300.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de morrinhos – GO. **Rev. Bras. Saúde prod. Na.**, v.8, n.3, p. 205-211, jul/set, 2007.

REIBNITZ, M.G.R., TAVARES, L.B.B., GARCIA, J.A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAsa positivos em queso. **Revista Argentina de microbiologia**, Buenos Aires, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

REGULAMENTO DE INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL (RIISPOA). Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962. **Diário Oficial da União**, 7 jul. 1952.

REZENDE, P. H. L.; MENDONÇA, E. P.; MELO, R.T.; COELHO, L. R.; MONTEIRO, G. P.; ROSSI, D. A. Aspectos sanitários do queijo minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V. 65, N. 377, Nov/Dez - 2010

ROBINSON D. A., ENRIGHT M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(12):3926-34, 2003.

ROCHA, J.S., BURUTI, F.C.A., SAAD, S.M.I. **Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.58 no.2 Belo Horizonte Apr. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000200016>, acesso em 09/10/2012

RODRIGUES, F. T.; VIERIA, M. D.; SANTOS, J. L.; ARAUJO, W. C.; ANDRADE, N. J.; BRANDÃO, S. C. C. **Características microbiológicas de queijo tipo minas frescal comercializados em Viçosa-MG**. In: XIII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, julho 1995, Juiz de Fora. Anais: Centro de Ensino e Pesquisa/ Instituto Cândido Tostes, p.233–235, 1995.

ROSA, V. P. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2004.

SALOTTI, B.M., CARVALHO, A.C.F.B., AMARAL, L.A., VIDAL-MARTINS, .A.M.C., CORTEZ, A.L. **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, abr./jun. 2006.

SANTANA, E. H. W. et al. Artigo de Revisão: Estafilococos em Alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, jul./set. 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotólicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. **Evolução da Microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota**. Ver. Inst. Adolfo Lutz. 69(1), p38-46, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1997. p. 310.

SILVA, C. A. M. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro**. In Congresso brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos, Fortaleza, v. 17, p.134, 1998.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 32-37, julho 2004

SILVA, N.da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F.A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed, São Paulo: Livraria Varela, 2007, 552p.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.;ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 241-248, fev. 2003.

SILVA, M.C.D.; SILVA, J.V.L.; RAMOS, A.C.S.; MELO, R.O.; OLIVEIRA, J.O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.1, p.226-230, 2008.

VILELA, M.A.P.; REZENDE, P.R.; MEURER, V.M., ALMEIDA, J.A. Incidência de Estafilococos Produtores de Coagulase em Queijo .Minas. Frescal Comercializado na Cidade de Juiz de Fora e região. **Revista do Instituto de Laticínios .Cândido Tostes.**, Juiz de Fora, n.31, p. 140-143, 2001.

VINHA, B. M.; PINTO, C. L. O.; SOUZA, M. R. M.; CHAVES, J. B. P. Fatores socioeconômicos da produção de queijos frescal em agroindústrias familiares de viçosa, MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n9, p.2023-2029, set, 2010

WESZ, J.V.J.; TRENTIN, I.C.L. **Desenvolvimento e agroindústria familiar.** In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 42, 2004, Cuiabá. Anais... Cuiabá: Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2004.

## ANEXO I

Quadro I: Codificação das amostras por cidade:

<b>Código</b>	<b>Numeração das amostras</b>	<b>Cidade</b>
APA	1 a 4	Aparecida de Minas (*)
ARA	5 a 8	Araguari
ARP	9 a 12	Araporã
ARX	13 a 16	Araxá
CAM	17 a 19	Campina Verde
CAP	20 a 22	Campo Florido
CAN	23 e 24	Canápolis
CAS	25 a 28	Cascalho Rico
CON	29 a 31	Conceição das Alagoas
COR	32 a 34	Coromandel
DEL	35 e 36	Delta
EST	37 a 39	Estrela do Sul
FRO	40 a 43	Fronteira
FRU	44 e 45	Frutal
GUR	46 e 47	Guriatã
IBI	48 a 50	Ibiá
IND	51 e 52	Indianópolis
IRA	53 e 54	Irai de Minas
ITA	55 a 57	Itapajipe
ITU	58 a 61	Ituiutaba
ITR	62 a 65	Iturama
LAG	66 a 69	Lagoa Formosa
MON	70 a 73	Monte Alegre
MOC	74 a 76	Monte Carmelo
NOV	77 a 81	Nova Ponte
PAT	82 e 83	Patos de Minas
PAR	84 a 86	Patrocínio
PER	87 e 88	Perdizes
PLA	89	Planura
PRA	90 a 92	Prata
PRT	93 a 95	Pratinha
ROM	96 e 97	Romaria
SAC	98 a 100	Sacramento
SAN	101 a 103	Santa Juliana
SAV	104 a 106	Santa Vitória
SOG	107 e 108	São Gotardo
SER	109 e 110	Serra do Salitre
UBA	111 a 113	Uberaba
UDI	114 a 117	Uberlândia

(\*) Distrito de Frutal