

## CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL\*

### CHARACTERIZATION OF STRAINS OF *Staphylococcus aureus* ISOLATES FROM MINAS ARTISANAL CHEESE

Viviane de Souza<sup>1,2</sup>, Poliana de Castro Melo<sup>2</sup>, Antonio Nader Filho<sup>2</sup>, Sandra de Oliveira Conde<sup>2</sup>, Maria Izabel Merino de Medeiros<sup>2,3</sup>, Flavio Augusto Fogaça Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-Ce

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP

<sup>3</sup> Pesquisadora Científica ITAL-APTA

\* Dados obtidos durante a execução do Doutorado da primeira autora, na FCAV-UNESP Jaboticabal.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Queijo Minas Artesanal, PCR.

#### Introdução

Visando manter a tradição na produção de queijos, o governo de Minas Gerais, por meio do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), regulamentou a produção de queijo Minas Artesanal no referido Estado. Segundo a Lei nº 14.185 (IMA, 2002), entende-se por queijo Minas Artesanal o queijo produzido segundo a tradição histórica e cultural da região onde for produzido, tendo como matéria prima leite integral de vaca, hígido, recém ordenhado e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas.

Considerando-se que esse tipo de queijo é produzido a partir de leite cru e não é submetido a tratamento térmico, o risco de ser veiculador de microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, constitui importante problema de Saúde Pública.

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas Artesanal, produzidos na microrregião de Araxá, em Minas Gerais, através da quantificação, identificação e confirmação genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus*.

#### Material e Métodos

Durante o período de Janeiro a Julho de 2009, foram analisadas 30 amostras de queijos Minas Artesanal da microrregião de Araxá, todas de uma única marca, devidamente registrada no Instituto Mineiro de Agropecuária, colhidas em diferentes pontos de venda no comércio varejista do município de Sacramento-MG.

A colheita das amostras foi realizada em dias diferentes, visando obter lotes distintos do produto. No momento da amostragem, foi realizada a anotação dos dados referentes à data de fabricação e o prazo (data) de validade dos queijos avaliados. As amostras foram transportadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas ao Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal – SP.

De cada amostra foi pesado assepticamente e transferido para um saco plástico estéril, uma alíquota de 25 g, sendo essa homogeneizada em aparelho Stomacher, com 225 mL de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim uma diluição inicial de  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até  $10^{-6}$ , sendo utilizado o mesmo diluente. Das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  foram retirados 0,1 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-Parker. A seguir, com auxílio de um bastão em forma de “L” esterilizado, foi procedida a distribuição do inóculo por toda a superfície do meio e as placas foram incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Após incubação, foram contadas as placas contendo de 20 a 200 colônias, separadamente, colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas ou não por halo claro, além das que se apresentavam somente negras e brilhantes. Os números de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente a placa de contagem, obtendo-se assim

o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus* spp. A seguir, 3 a 5 colônias de cada tipo foram semeadas em tubos com Agar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Após, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-positivos, agrupadas em forma de cachos de uva, foram submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoina (VP) (Mac FADDIN, 1976). Para a extração do DNA bacteriano foi utilizado o Kit Invitek - Uniscience®, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas. Posteriormente, a confirmação molecular dos isolados de *S. aureus*, para a identificação da espécie, foi feita a partir da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo descrito por Martineau et al. (1998).

### Resultados e Discussão

Das 30 amostras analisadas, 28 (93,3%), apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal no Estado de Minas Gerais (IMA, 2002).

As contagens de estafilococos coagulase-positivos obtidas nas amostras do presente estudo variaram de  $3,0 \times 10^2$  a  $2,0 \times 10^7$  UFC/g, com média aritmética de  $7,2 \times 10^5$  UFC/g.

Araujo et al. (2004) ao analisarem 37 amostras de queijos Minas Artesanal da região de Araxá – MG, obtiveram 33 (82,2%) amostras positivas para estafilococos coagulase-positivos, todas com contagens superiores a  $10^3$  UFC/g, sendo que destas, 8 (21,6%) apresentaram contagens acima de  $10^5$  UFC/g.

Dentre o total de 30 amostras analisadas, foram isoladas 63 estirpes de estafilococos coagulase-positivos, sendo que em 56 (88,8%) foi amplificado o fragmento de DNA cromossômico específico da espécie de *S. aureus*.

Ao realizar a técnica de PCR, a presença de *Staphylococcus aureus* foi confirmada em 28 (93,3%) amostras de queijo Minas Artesanal analisadas.

O alto índice de *S. aureus* pode estar relacionado com a ocorrência de mastite bovina no rebanho leiteiro, porém, fatores como obtenção inadequada de leite e hábitos higiênicos insatisfatórios, podem contribuir para o aumento dos índices desse microrganismo em queijos artesanais (PINTO, 2004).

### Conclusões

As análises efetuadas neste estudo evidenciaram que 93,3% das amostras de queijo Minas Artesanal analisadas estavam em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, por apresentarem *Staphylococcus aureus* acima dos padrões legais vigentes.

### Referências Bibliográficas

ARAÚJO, R. A. B. M. et al. Avaliação Microbiológica do queijo minas artesanal da região de Araxá. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., 2004, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Templo. 2004. p. 93-96.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Disponível em: [http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf). Acesso em: 16 jan. 2011.

Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312 p.

MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.

PINTO, M. S. **Diagnóstico Sócio-econômico cultural e Avaliação Microbiológica do Queijo Minas Artesanal do Serro – MG. Viçosa – MG**, 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Autor a ser contactado: Viviane de Souza. e-mail: [vivianesouzavet@yahoo.com.br](mailto:vivianesouzavet@yahoo.com.br)