

# **Veterinária e Zootecnia**

**Suplemento: Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do  
Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL  
10 a 12 de Junho de 2013.**

**Vet e Zootec.  
2013 junho; 20(2 Supl 1): 001-460  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
ISSN Impresso 0102 -5716  
ISSN Eletrônico 2178-3764  
Botucatu - SP – Brasil**

## 041 - CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS EM QUEIJO MINAS FRESICAL DE PRODUÇÃO ARTESANAL

### CHARACTERIZATION OF STRAINS OF *Staphylococcus aureus* ISOLATES IN HANDMADE MINAS FRESICAL CHEESE

Viviane de Souza<sup>1</sup>  
Natacha Deboni Cereser<sup>2</sup>  
Monica Costa Oliveira<sup>3</sup>  
Sandra de Oliveira Conde<sup>4</sup>  
Poliana de Castro Melo<sup>5</sup>  
Antonio Nader Filho<sup>6</sup>

**Introdução:** O queijo Minas Frescal produzido artesanalmente é um produto de ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país. Porém, trata-se de um alimento altamente perecível por apresentar elevado teor de umidade, sofrer grande manipulação, não passar por maturação e ser normalmente produzido a partir de leite cru, condições que aumentam o risco deste produto veicular micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, constituindo-se em importante problema de Saúde Pública. Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de avaliar a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal, produzido sem acompanhamento do Serviço Oficial de Inspeção, comercializados em Ribeirão Preto-SP, por meio da quantificação, identificação e confirmação genotípica de estirpes de *S. aureus*.

**Material e Métodos:** Durante o mês de agosto de 2009, foram analisadas 22 amostras de queijo de produção artesanal, comercializadas em dois Mercados Municipais de Ribeirão Preto-SP, adquiridas aleatoriamente. Após acondicionamento em caixa isotérmica com gelo, as amostras foram transportadas até o Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Unesp-Jaboticabal/SP para processamento. 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 36°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

<sup>1</sup> Pesquisadora, EMBRAPA Caprinos e Ovinos – Sobral-CE. Estrada Sobral-Groaíras, Km 4. Caixa Postal: 145. CEP: 62010-970. Sobral-CE. Tel. (88) 3112-7573. Email: viviane.souza@embrapa.br

<sup>2</sup> Professora, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA, Universidade Federal de Pelotas-RS; Email: natachacereser@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Doutoranda do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP; Email: vetmonica@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Técnica de laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP – USP; Email: conde\_so@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Pós-doutoranda em Morfologia, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia-MG; Email: policame@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Professor Titular Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP; Email: nader@fcav.unesp.br

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 identificadas como 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). 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. (1). Os resultados obtidos foram confrontados com os limites estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, para queijo de muito alta umidade (55%) de coagulação enzimática, sem ação de bactérias lácticas.

**Resultados e Discussão:** Todas as amostras analisadas apresentaram contagens de estafilococos coagulase-positivos superiores ao padrão estabelecido pela ANVISA. As contagens de estafilococos coagulase-positivos obtidas nas amostras do presente estudo variaram de  $2,1 \times 10^5$  a  $2,4 \times 10^7$  UFC/g, com uma média geométrica de  $2,0 \times 10^6$  UFC/g. Foram isoladas 46 estirpes de estafilococos coagulase-positivos, sendo que em 22 (48,0%) foi amplificado o fragmento de DNA cromossômico específico da espécie de *S. aureus*. Ao realizar a técnica de PCR, a presença de *S. aureus* foi confirmada em 12 (54,5%) amostras de queijo Minas Frescal artesanal analisadas. Além de diminuir a qualidade do produto contaminado, a presença desses micro-organismos coloca em risco a saúde dos consumidores, principalmente pela sua capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis. O alto índice de *S. aureus* obtido nas amostras do presente estudo pode estar relacionado com a ausência de boas práticas agropecuárias na obtenção do leite e com a ausência de boas práticas de fabricação na produção dos queijos artesanais. O controle sanitário do rebanho, a obtenção do leite segundo os padrões de higiene, o controle higiênico-sanitário das queijarias e a limpeza e desinfecção dos equipamentos e utensílios utilizados no processo de produção, são indispensáveis para prevenir a contaminação durante a manipulação e garantir a qualidade do produto final.

**Conclusões:** O estudo revelou um elevado percentual de amostras de queijo Minas Frescal artesanal, impróprias para consumo devido altas contagens de estafilococos coagulase-positivos. Os resultados evidenciam ainda que estirpes de *S. aureus* podem ser veiculadas pelo queijo Minas Frescal, produzido em estabelecimentos não registrados em Órgãos Oficiais de Inspeção e, largamente consumido pela população brasileira. Considerando o potencial enterotoxigênico do micro-organismo, fica evidente o risco que este alimento pode representar à saúde pública.

**Agradecimentos:** Ao CNPq.

#### Referências:

1. MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 618-623, 1998.