

1 **PESQUISA DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS**
2 **ARTESANAL DE ARAXÁ**

3
4 **Resumo** – Com o objetivo de conhecer as características fenotípicas e genotípicas das estirpes
5 de *Staphylococcus aureus* isoladas de Queijos Minas Artesanal, produzido na região de Araxá
6 – MG, 30 amostras de uma determinada marca comercializada no município de Sacramento-
7 MG, foram analisadas bioquímica e molecularmente. Deste total, 100% estavam em
8 desacordo com a Lei nº 14.185 que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas
9 Artesanal, devido à elevada contagem de estafilococos coagulase-positivo. Para a análise
10 molecular, genotipou-se 63 colônias oriundas das 30 amostras de Queijo Minas Artesanal.
11 Todas as colônias foram caracterizadas bioquimicamente como estafilococos coagulase-
12 positiva, sendo que 56 (88,8%) foram positivas para a espécie *S. aureus* nas análises
13 moleculares. Os resultados obtidos indicam a necessidade de adoção de medidas por parte das
14 autoridades sanitárias, uma vez que tais queijos por serem produzidos com leite cru, não
15 pasteurizado, colocam em risco a saúde dos consumidores.

16
17 Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, Queijo Minas Artesanal, PCR.

18
19 **RESEARCH OF STRAINS OF *Staphylococcus aureus* ISOLATES FROM MINAS**
20 **ARTISANAL CHEESE FROM ARAXÁ**

21
22 **ABSTRACT** - Thirty samples of a brand cheese commercialized in the municipality of
23 Sacramento MG Brazil were analyzed for their biochemical and molecular traits to detect the
24 phenotype and genotype of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Minas Artisanal
25 Cheese produced in the region of Araxá MG Brazil. All samples failed to comply with Law
26 14185 on the production process of Minas Artisanal Cheese, owing to high counts in
27 coagulase-positive staphylococcus. Sixty-three colonies from 30 samples of Minas Artisanal
28 Cheese were genotyped for molecular analysis. All colonies were biochemically detected as
29 coagulase-positive staphylococcus, of which 56 (88.8%) were positive for *S. aureus* in
30 molecular analyses. Results reveal the need for urgent measures by health authorities since the
31 above mentioned cheese, produced from non-pasteurized milk, put at risk consumers' health.

32
33 Keywords: *Staphylococcus aureus*, Minas Artisanal Cheese, PCR.

34

35 **Introdução**

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

44 O Programa Queijo Minas Artesanal promove a identidade dos queijos artesanais
45 produzidos nas regiões de Araxá, Canastra, Cerrado, Serro, Campo das Vertentes e Triângulo
46 Mineiro. O interessado em cadastrar-se como produtor de Queijo Minas Artesanal deve
47 atender as especificações referentes à produção, equipamentos, higiene, controle de saúde dos
48 trabalhadores e dos animais, entre outros, e seguir a regulamentação preconizada pelo
49 Instituto Mineiro de Agropecuária, órgão responsável.

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

53 O *S. aureus* é conhecido como um dos principais agentes causadores da mastite
54 subclínica causando danos à glândula mamária comprometendo as características físico-
55 químicas e microbiológicas do leite sem que o produtor perceba sua presença. Por se tratar de
56 um micro-organismo patogênico que apresenta uma grande capacidade de adaptação a
57 condições ambientais adversas, representa um importante agente de toxi-infecção alimentar.
58 A presença de *Staphylococcus* nos alimentos é encarada como um indicador de deficiências

59 de carácter higiênico no processo de obtenção do alimento e particularmente nas operações de
60 manipulação.

61 As limitações conferidas pelos métodos de cultivo levaram ao desenvolvimento de
62 técnicas de reação em cadeia pela polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) as quais
63 permitem a detecção de micro-organismos mesmo em números reduzidos (FORSMAN et al.,
64 1997; PHUEKTES et al., 2003), tornando-se uma opção promissora para uma rápida
65 identificação bacteriana pela utilização de sequências de DNA espécie-específicas.

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

70

71 **Material e Métodos**

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

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

83 De cada amostra foi pesado assepticamente e transferido para um saco plástico estéril,
84 uma alíquota de 25 g, sendo essa homogeneizada em aparelho Stomacher, com 225 mL de
85 água peptonada 0,1%, obtendo-se assim uma diluição inicial de 10^{-1} . A partir desta diluição,
86 foram preparadas diluições decimais até 10^{-6} , sendo utilizado o mesmo diluente. Das diluições
87 10^{-3} a 10^{-6} foram retirados 0,1 mL e depositados em placas de Petri contendo Ágar de Baird-
88 Parker. A seguir, com auxílio de um bastão em forma de “L” esterilizado, foi procedida a
89 distribuição do inóculo por toda a superfície do meio e as placas foram incubadas a 35°C por
90 24 a 48 horas. Após incubação, foram contadas as placas contendo de 20 a 200 colônias,
91 separadamente, colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundadas
92 ou não por halo claro, além das que se apresentavam somente negras e brilhantes. Os números
93 de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da
94 diluição correspondente a placa de contagem, obtendo-se assim o valor da contagem
95 presuntiva de *Staphylococcus* spp. A seguir, 3 a 5 colônias de cada tipo foram semeadas em
96 tubos com Agar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Após, foram preparados
97 esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-
98 positivos, agrupadas em forma de cachos de uva, foram submetidas às provas de catalase, da
99 coagulase livre e de produção de acetoina (VP) (Mac FADDIN, 1976). Para a extração do
100 DNA bacteriano foi utilizado o Kit Invitek - Uniscience®, que contém o protocolo de
101 extração de DNA para bactérias Gram-positivas. Posteriormente, a confirmação molecular
102 dos isolados de *S. aureus*, para a identificação da espécie, foi feita a partir da amplificação de
103 fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo
104 descrito por Martineau et al. (1998).

105

106

Resultados e Discussão

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

110 As contagens de estafilococos coagulase-positivos obtidas nas amostras do presente
111 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.

112 Araujo (2004) ao analisarem 37 amostras de queijos Minas Artesanal da região de
113 Araxá – MG, obtiveram 33 (89,2%) amostras positivas para estafilococos coagulase-
114 positivos. A alta contagem de estafilococos coagulase positiva, possivelmente *S. aureus*, é
115 comum em trabalhos que analisam queijos produzidos a partir de leite cru no Brasil, como o
116 Queijo Minas Artesanal.

117 Para a análise molecular, genotipou-se diversas colônias de uma mesma amostra,
118 totalizando 63 colônias oriundas das 30 amostras de Queijo Minas Artesanal, sendo todas
119 caracterizadas bioquimicamente como *Staphylococcus* coagulase positiva.

120 Dentre o total de 30 amostras analisadas, foram isoladas 63 estirpes de estafilococos
121 coagulase-positivos, sendo que em 56 (88,8%) foi amplificado o fragmento de DNA
122 cromossômico específico da espécie de *S. aureus* (Figura 1).

123 Medeiros et al. (2013) realizaram um monitoramento epidemiológico molecular de
124 estirpes de *S. aureus* potencialmente toxigênicas isoladas no processo de produção do queijo
125 Minas frescal em micro-usina do Estado de São Paulo, no período de Junho de 2008 a Julho
126 de 2009, e verificaram que das 74 estirpes de estafilococos coagulase positivos isoladas,
127 somente 41 (55,4%) amostras foram confirmadas como sendo *Staphylococcus aureus*.

128 Ao realizar a técnica de PCR, a presença de *Staphylococcus aureus* foi confirmada em
129 28 (93,3%) amostras de queijo Minas Artesanal analisadas.

130 O alto índice de *S. aureus* encontrados nas amostras do presente estudo, pode estar
131 relacionado com a ocorrência de mastite bovina no rebanho leiteiro, porém, fatores como

132 obtenção inadequada de leite e hábitos higiênicos insatisfatórios, podem contribuir para o
133 aumento dos índices desse micro-organismo em queijos artesanais (PINTO, 2004). O *S.*
134 *aureus* é classificado entre os patógenos contagiosos, uma vez que a exposição de quartos
135 mamários não infectados é geralmente limitada ao processo de ordenha (FOX & GAY, 1993;
136 SMITH & HOGAN, 1993). A principal fonte de infecção são animais com quartos mamários
137 infectados por *S. aureus*, além da pele do úbere e dos tetos contaminados, enquanto os bocais
138 da ordenhadeira são considerados a principal via de transmissão da infecção (MYLLYS et al.,
139 1997).

140 As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações
141 importantes em Saúde Pública, tendo em vista que toxinas podem ser excretadas no leite e
142 permanecer estáveis nos produtos destinados aos consumidores (FAGUNDES & OLIVEIRA,
143 2004).

144 **Conclusão**

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

148

149 **Agradecimentos**

150 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

151 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

152

153 **Referências**

154 ARAUJO RABM. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-
155 químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal da região de Araxá. Viçosa – MG,
156 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Alimentos) – Universidade

157 Federal de Viçosa, Viçosa - MG. Disponível em:
158 <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2004>
159 [/188343f.pdf](http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2004/188343f.pdf)
160 FAGUNDES H; OLIVEIRA CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus*
161 *aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*. 2004; 34(4):1315-1320.
162 FORSMAN P, TILSALA-TIMISJARVI A, ALATOSSAVA T. Identification of
163 staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer
164 regions. *Microbiology*. 1997; 143(11):3491-3500.
165 FOX L, GAY J. Contagious Mastitis. In: E. Hunt, K. L. Anderson (eds.): *The Veterinary*
166 *Clinics of North America: Food Animal Practice*. Philadelphia: W.B. Saunders Company;
167 1993; p.475-487.
168 IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de
169 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal e dá outras
170 providências. Disponível em:
171 http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf. Acesso em: 22 ago
172 2014.
173 Mac FADDIN JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: The
174 Williams & Wilkins, 1976; 312 p.
175 MARTINEAU F, PICARD FJ, ROY PH, OUELLETTE M, BERGERON MG. Species-
176 specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*.
177 *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(3):618-623.
178 MEDEIROS MIM, NADER FILHO A, SOUZA V, MELO PC, FERREIRA LM,
179 CANALEJO LMM. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de
180 *Staphylococcus aureus* na produção de Queijo Minas Frescal. *Ciência Animal Brasileira*

181 [Internet]. 2013; 14(1): 98-105. Disponível em:
182 <http://http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/14972>.
183 MYLLYS V, RIDELL J, BJORKROTH I, PYORALA SHK. Persistence in bovine mastitis of
184 *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis,
185 ribotyping and biotyping. Veterinary Microbiology. 1997; 57(1-2):245-251.
186 PINTO, M. S. Diagnóstico Sócio-econômico cultural e Avaliação Microbiológica do Queijo
187 Minas Artesanal do Serro – MG. Viçosa – MG, 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em
188 Ciências e Tecnologias de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
189 Disponível em:
190 <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2004>
191 [/183060f.pdf](http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/ciencia%20e%20tecnologia%20de%20alimentos/2004/183060f.pdf).
192 PHUEKTES P, MANSELL P, BROWNING G.F. Multiplex polymerase chain reaction as a
193 mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
194 *dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. Journal of Dairy Research. 2003;
195 70(2):149-155, 2003.
196 SMITH K, HOGAN J. Environmental Mastitis. In: E. Hunt, K. L. Anderson (eds.): The
197 Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Philadelphia: W.B. Saunders
198 Company; 1993. p.489-498.
199
200
201
202
203
204
205

206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220

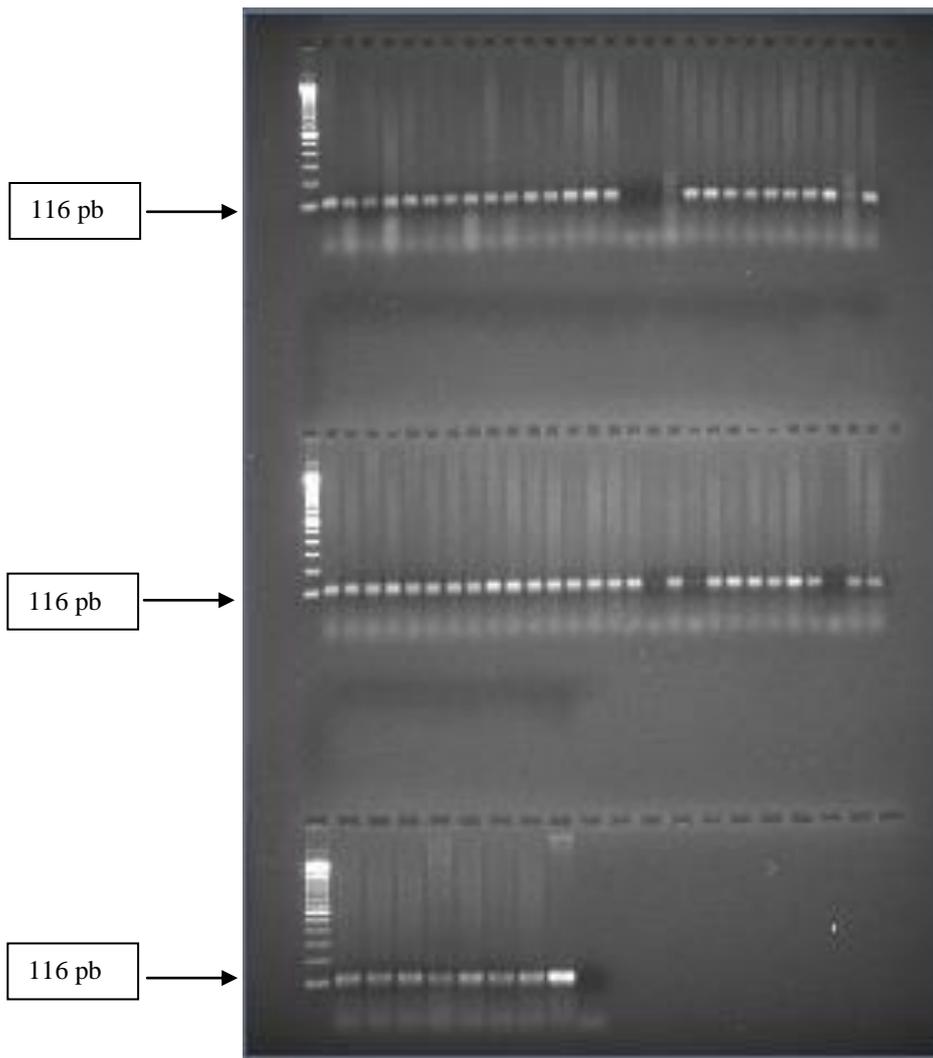


Figura 1: Amostras submetidas à análise molecular para confirmação da espécie *S. aureus*.

PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®)

C.P.: Controle positivo (utilização de DNA da ATCC 23.235)

C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada)