

# PESQUISA DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL, PRODUZIDO DE FORMA ARTESANAL E INDUSTRIAL, COMERCIALIZADO NA CIDADE DE CANOAS/RS, BRASIL

Ana Eliza Vieira Senger<sup>1</sup>  
Delmar Bizani<sup>2</sup>

## RESUMO

O queijo Minas Frescal é uma variedade não maturada e apresenta uma atividade de água (Aa) muito elevada, tornando-se mais suscetível à ação de bactérias patogênicas e constituindo assim um perigo à saúde do consumidor. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria presente nos alimentos de origem animal e muito relacionada a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de algumas linhagens em produzir enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas. O presente trabalho avaliou e comparou o padrão microbiológico de queijos tipo Minas Frescal de produção artesanal e industrial, pesquisando a presença *S. aureus* e estabelecendo uma relação entre os tipos de produção. Foram coletadas, de forma aleatória, 30 amostras de queijo Minas Frescal de produção artesanal, em feiras livres na cidade de Canoas, RS e 30 amostras de produção industrial, fiscalizadas, em mercados locais. As análises foram realizadas em ágar seletivo indicador para *S. aureus*, observando a conformidade das amostras em relação aos padrões previstos pela legislação vigente. A análise de produção EE foi realizada por teste imunoenzimático, RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm GmbH), através do leitor de ELISA em 450nm (A450 nm <0,5). O queijo de produção artesanal apresentou contaminação por *S. aureus* superior aos padrões legais em 40 % (12) das amostras, já o queijo industrial de 23,3 % (7), ambos com uma variação de valores de  $5,1 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> a  $> 5,0 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>. Predominaram as EEA, EEB, seguida da EED para as amostras artesanais. Enquanto EEB foi predominante entre as amostras industriais.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, queijo minas Frescal

<sup>1</sup> PUCRS - Mestrado em Gerontologia Biomédica. e-mail: nutrisa@brturbo.com.br

<sup>2</sup> UNILASALLE, Pós-Graduação e Pesquisa, Lab. de Microbiologia. e-mail: delmar@unilasalle.edu.br

## ABSTRACT

### **Research about *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese, produced of artisanal and industrial form, commercialized in the city of Canoas/RS, Brazil.**

The Minas cheese is a variety not matured and has a very high water activity ( $A_w$ ), making it more susceptible to the action of pathogenic bacteria thus a danger to health of the consumer. *Staphylococcus aureus* is bacteria present in food of animal origin and closely related to outbreaks of food poisoning due to ability of some strains to produce pre-formed staphylococcal enterotoxins (SE). This study evaluated and compared the standard microbiological cheese samples of artisanal and industrial production, inquiring about the *S. aureus*, establishing a relationship between the types of production. Were collected at random, 30 samples of Minas cheese artisan production of the street markets in the city of Canoas, RS, and 30 samples of industrial production, audited, in local markets. The tests were performed on selective agar indicator for *S. aureus*, noting the conformity of samples in relation to the standards set by law. SE analysis of production was performed by immunoassay tests, RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm GmbH), by ELISA reader at 450nm (A450 nm <0.5). Artisanal Cheese production presented contamination by *S. aureus* above the legal standards by 40% (12) of the samples, since the cheese industry of 23.3% (7), both with a range of values of  $5.1 \times 10^2$  CFU  $g^{-1}$  to  $> 5.0 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$ . For artisan samples were predominant SEA, SEB, followed by. SEB was predominant industrial samples.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, Minas Frescal cheese

## INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal é um produto que possui ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população na maioria das regiões do país. Por se tratar de uma variedade que não passa pelo processo de maturação, esse tipo de queijo apresenta elevada atividade de água ( $A_a$ ), sendo bastante suscetível à ação de bactérias patogênicas (Quintana e Carneiro, 2007; Clemente *et al.*, 2003). Fatos como esses levaram à mudança da legislação brasileira, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS). Pela legislação vigente (Resolução RDC N. 12, de 2 de Janeiro de 2001, [Brasil, 2001]), são estipulados limites para a presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos, enquanto que a anterior (Portaria 451 de 19 de setembro de 1997, [Brasil, 2007]), estipulava parâmetros, apenas, para contagens de *Staphylococcus aureus*.

Por muitos anos, *S. aureus* foi considerada a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como a coagulase, utilizada na rotina laboratorial para identificação desse microrganismo (Kloos e Bannerman, 1999;

Konemam *et al.*, 2009). Posteriormente, outras espécies produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas e, inclusive, surtos de intoxicação alimentar já foram atribuídos a essas duas espécies (Pereira *et al.*, 2001; Jay, 2005; Lamaita *et al.*, 2005).

A indústria adota as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que consiste em um sistema de controle de qualidade, que visa a garantir a segurança alimentar no processo de industrialização, obtendo, dessa forma, um produto seguro e de boa qualidade (Furtado e Lourenço Neto, 1990).

De acordo com a legislação bromatológica do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (Brasil, 1997), 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.

Quando a produção do queijo ocorre de forma artesanal, nem sempre são observadas as BPF e os controles higiênico-sanitários recomendados, pondo em risco a saúde do consumidor. A presença de microrganismos contaminantes de diferentes origens (animal, ambiente ou manipulador) é responsável pelas doenças transmitidas por alimentos (DTAs), como também por modificações físico-químicas do alimento, alterando o flavor do produto final (Figueiredo, 1999; Hoffman *et al.*, 2001; Sá *et al.*, 2004).

O *S. aureus* está envolvido em diversos casos de toxinfecções alimentares, pela sua capacidade toxigênica e termorresistência da toxina e em diferentes tipos de alimentos, sendo que os queijos despontam como um dos principais alimentos relacionados com essas enfermidades (Jay, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultrapasteurização. São nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Já foram descritos 18 tipos de enterotoxinas, as quais compartilham similaridade, na estrutura e na sequência, e diferenças antigênicas. Os tipos clássicos EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH e EEI são considerados os de maior ocorrência (Borges *et al.*, 2008). De acordo com Nicolau *et al.* (2001), outras 12 enterotoxinas já foram identificadas e caracterizadas, baseadas nas mesmas características, nos últimos anos.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as condições higiênicas sanitárias dos queijos tipo Minas Frescal, quanto à presença e à quantidade de *S. aureus* e a produção de toxinas. O estudo comparou queijos produzidos de forma artesanal, comercializado em feiras livres na cidade de Canoas/RS, com os produzidos de forma industrial e comercializados em supermercados da cidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Esta pesquisa foi realizada a partir de análise amostral casualizada, segundo a metodologia proposta por Silva *et al.* (2003). Durante o período de julho de 2008 a janeiro de 2009, foram adquiridas aleatoriamente as amostras de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente, em feiras de produtos coloniais da cidade de Canoas, RS. As amostras não apresentavam qualquer informação sobre seu conteúdo, origem, data de fabricação e/ou validade. As amostras obtidas de queijo tipo Minas Frescal industrial obedeceram aos seguintes critérios: produção inspecionada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), produtos dentro do prazo de validade, elaboração por coagulação enzimática e sem a adição de bactérias lácticas. As coletas foram feitas aleatoriamente durante o mesmo período e em diferentes estabelecimentos da cidade.

A cada amostragem, foi coletado um queijo de aproximadamente 200g em cada estabelecimento, totalizando 30 amostras de cada tipo de processamento, (artesanal e industrial), totalizando 60 amostras. As amostras foram transportadas para o laboratório de microbiologia do Unilasalle/Canoas-RS, de forma asséptica e mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

### Preparo e Diluições das Amostras de Queijos para Contagem, Isolamento e Identificação de *S. aureus*

De cada amostra, foram pesados, asépticamente, 25 gramas do produto e adicionados 225 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85% p/v) com 0,1% (p/v) de Peptona (SSP), a fim de se obter a diluição inicial ( $10^{-1}$ ), a qual foi homogeneizada em garrafa previamente esterilizada. Posteriormente, 0,1 ml dessa diluição foi colocado em tubo de microdiluição *Eppendorf*, contendo 0,9 ml de solução peptonada (SSP) 0,1%, obtendo-se as diluições  $10^{-2}$  até  $10^{-5}$ .

Para a quantificação de *S. aureus*, foi utilizado o método de contagem “Spreadplate” em Ágar Baird Parker<sup>3</sup> suplementado com Emulsão de Gema de Ovo e Telurito de Sódio<sup>4</sup>, onde se depositou 0,1ml de cada diluição sobre a superfície do ágar e, com o auxílio de um bastão de vidro tipo “hockey” flambado, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio até a completa absorção. As placas foram incubadas, em estufa, a 35-37°C, por 24 a 48 horas e logo após, selecionadas aquelas que contiveram entre 20 e 200 colônias para contagem. Com as colônias

<sup>3</sup> Baird Parker-Ágar Seletivo (base). Art. nº 5406 - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

<sup>4</sup> Egg Yolk Tellurite Enrichment. Cód.: 520089 – Laborclin- Produtos para laboratórios, Ltda, Brasil.

típicas, foram realizadas provas bioquímicas de catalase e coloração de Gram. De cada placa com crescimento, foram colhidas três colônias típicas e inoculadas em tubos, contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)<sup>5</sup>, os quais foram incubados a temperatura entre 35-37°C por 24 horas. A partir do subcultivo crescido em BHI, foram realizadas as provas bioquímicas confirmativas em tubo e/ou sorológicas de hemólise e hemaglutinação (Flowers *et al.*, 1992).

### Provas Bioquímicas

Todas as provas bioquímicas para a identificação das linhagens de *S. aureus* foram realizadas conforme os métodos descritos por Konemam (2009). Os testes para detecção da produção de coagulase e termonuclease foram realizados segundo Lachica *et al.* (1972).

### Produção e Detecção de Enterotoxina

Os procedimentos de produção e análise das enterotoxinas estafilocócicas foram realizados segundo a metodologia estabelecida por Stamford *et al.* (2002).

**Produção da enterotoxina** – As linhagens que se apresentaram positivas para os testes de coagulase e termonuclease foram cultivadas em caldo BHI. Deste, uma alíquota de 2 mL foi transferida em 150 mL de BHI, enriquecido com 1 % de extrato de levedura (YE)<sup>6</sup> e submetido posteriormente à incubação em *shaker* a 150 rpm por 18 horas a 36°C.

**Purificação da enterotoxina** – Após a incubação, retirou-se uma alíquota de 2 mL de inóculo da cultura, que foi submetido à centrifugação e à filtragem em tubo *Ultrafree-Millipore*<sup>®</sup> 0,22 µm, a uma temperatura de 4°C por 15 minutos a 3000 rpm.

**Detecção das enterotoxinas** – Após o processo, retirou-se uma alíquota de 100 µl do filtrado, que foi colocado nos poços da placa de microdiluição do *Kit RIDASCREEN*<sup>®</sup> SET A, B, C, D, E (R-Biopharm GmbH) (Darmstadt, Alemanha), onde foi seguido o protocolo de preparação segundo os procedimentos definidos pelo fabricante. Após, as placas foram submetidas à análise no leitor de ELISA (EL 800 G PC- Bio-Tek<sup>®</sup>) a 450nm (A450 nm <0,5).

**Titulação da enterotoxinas** – As amostras que apresentaram títulos de VT (valor do teste) < 0,13 foram consideradas negativas para presença de enterotoxina e aquelas que apresentaram títulos de VT ≥ 0,13, consideradas positivas (Vernozy-Rozand, 1998). VT é a relação entre a fluorescência relativa do padrão e a fluorescência relativa da amostra.

<sup>5</sup> Brain Heart Infusion (BHI), DIFCO, Catálogo n° 241830, Detroit, EUA.

<sup>6</sup> Extrato de levedura (Yeast Extract), DIFCO, Catálogo n° 212750/0127-17, Detroit, EUA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram estudadas somente as linhagens de *S. aureus* positivas para os testes de coagulase e termonuclease.

De acordo com a tabela 1, os resultados obtidos evidenciam que do total de amostras analisadas para os queijos artesanais e industrializados, 60% (18/30) e 76,7% (23/30), respectivamente, apresentaram-se dentro dos padrões legais estabelecidos pela RDC nº12 da ANVISA, cujo limite para o queijo Minas Frescal sem adição de bactérias lácticas é, no máximo, de  $5,0 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>. O número de amostras industriais fora do padrão, mesmo que baixo, ainda representa uma contaminação preocupante. Para as amostras artesanais, a frequência de 40% das amostras é determinante de alimento impróprio para consumo. Esse nível de contaminação é considerado bastante elevado e pode favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócicas em condições apropriadas (Jay, 2005).

Neste trabalho, das 30 amostras artesanais analisadas, 12 (40%) se encontraram fora dos padrões estabelecidos pela legislação, sendo que duas amostras (6,7%) apresentaram uma contagem superior ao limite do teste ( $>5,0 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>).

Tabela 1. Contagem de *S. aureus* em amostras de queijo Minas Frescal artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas, RS.

UFC.g <sup>-1</sup> de <i>S. aureus</i>	Amostras Artesanais				Total	Amostras Industriais				Total
	ND - (%)		NF - (%)			ND - (%)		NF - (%)		
0 ou $< 1,0 \times 10^2$	16	(53,3)	-	-	16	20	(66,7)	-	-	20
$1,1 \times 10^2 - 5,0 \times 10^2$	2	(6,7)	-	-	2	3	(10,0)	-	-	3
$5,1 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$	-	-	6	(20,0)	6	-	-	4	(13,3)	4
$5,1 \times 10^3 - 5,0 \times 10^4$	-	-	4	(13,3)	4	-	-	3	(10,0)	3
$> 5,0 \times 10^4$	-	-	2	(6,7)	2	-	-	-	-	-
Total	18	(60)	12	(40)	30	23	(76,7)	7	(23,3)	30

ND: Número de amostras dentro do padrão estabelecido pela legislação, NF: Número de amostras fora do padrão estabelecido pela legislação.

Estudos relacionados à contaminação por *S. aureus* em queijo Minas Frescal artesanal obtiveram resultados aproximados, como a pesquisa realizada por Brant *et al.* (2007), que avaliou a qualidade microbiológica de 20 amostras de queijo Minas Frescal da região de Serro/MG e detectou níveis de contaminação acima dos padrões legais em 82,5% das amostras, as quais apresentavam contagens superiores a  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Da mesma forma, Peresi *et al.* (2001) analisaram 30 amostras de queijo Minas Frescal artesanal e detectaram contagens acima dos padrões em 76% das amostras.

A presença de *S. aureus* além dos limites aceitáveis pode estar relacionada com a manipulação dos queijos, pois os manipuladores representam as principais fontes de transmissão dessa bactéria (Borges *et al.*, 2008). Segundo Stamford *et al.* (2006), entre os *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* é a mais prevalente em toda a cadeia do leite *in natura*, o que seria a fonte para a contaminação para os seus subprodutos.

Resultados superiores foram encontrados por Loguercio e Aleixo (2001) também com queijo Minas Frescal artesanal em Cuiabá – MT, onde constataram que 96,67% (30) das amostras analisadas apresentavam contagens de *S. aureus* em desacordo com o padrão estabelecido pela legislação, variando de  $10^3$  a  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>.

É importante salientar que, muitas vezes, na fabricação dos produtos artesanais, o processo térmico aplicado no leite tenha sido ineficiente ou, como é mais comum em produções coloniais, tenha sido utilizado o leite cru, não pasteurizado, na fabricação do queijo. Para Muratori *et al.* (2007) e Zaffarii *et al.* (2007), as contagens elevadas desse microrganismo são indicativas da presença de enterotoxinas estafilocócicas e representam um risco à saúde do consumidor, além de comprometerem a qualidade e o prazo de validade dos produtos.

Das amostras industrializadas, 23 (76,7%) estavam dentro dos padrões desejáveis, porém 7 (23,3%) tiveram uma detecção de *S. aureus* superior aos limites estabelecidos pela legislação. Na comparação com os resultados obtidos por Sabioni e Maia (1998), há uma grande semelhança quando analisaram 30 amostras de queijo Minas Frescal industrializados, onde concluíram que 70% apresentavam contagens de *S. aureus* acima de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes também foram observados por Barros *et al.* (2004), no município do Rio de Janeiro – RJ, e por Castro *et al.* (2007) em Teresina – PI.

Os valores de 40% e 23,3%, respectivamente, para queijo Minas Frescal artesanal e industrial obtidos neste trabalho, mesmo que inferiores quando comparados a outras pesquisas, ainda assim estão em desacordo com a legislação. Resultados inferiores a este trabalho foram encontrados por Salotti *et al.* (2006).

Melhorias sanitárias na fabricação de produtos de origem animal têm mostrado resultados satisfatórios. Segundo Durek (2005), resultados de grande relevância e influência na qualidade do produto final foram obtidos após a adoção das BPF em 189 estabelecimentos produtores de laticínios registrados no SIF, nas regiões norte, sul, sudeste e centro-oeste do Brasil.

Diversos autores têm se preocupado em avaliar a qualidade do leite cru que será posteriormente beneficiado. Stamford *et al.* (2002) avaliaram os pontos críticos de controle (PCCs) numa plataforma de processamento de leite da cidade de Recife – PE e observaram que os pontos críticos no fluxograma de beneficiamento do leite eram os tanques de estocagem e o processo de envase.



Atualmente, parte do programa de BPF, considerado pré-requisito para a implantação do sistema de APPCC, foi transformada em PPHO - Procedimentos Padrões de Higiene Operacional. Segundo a Resolução DIPOA/SDA N° 10 (Brasil, 2003), que instituiu o programa genérico de PPHO, esses procedimentos são itens das BPF que, por sua importância para o controle de perigos, foram acrescentados de procedimentos de monitoramento, ação corretiva, registros e verificação, para realmente possibilitar um controle efetivo (Brasil, 2008).

O sistema APPCC quando aplicado em conjunto com as BPF, as quais consistem em requisito básico para a implantação desse sistema, apresenta melhor resultado, pois existe uma complementação de esforços para controlar os pontos que oferecem perigos de contaminação do produto (Neto, 2006).

### Perfil Enterotoxigênico das Linhagens de *S. aureus*

As linhagens de *S. aureus* foram testadas quanto à produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE) e apresentaram um perfil toxigênico variável conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Perfil enterotoxigênico das linhagens de *S. aureus* isolados a partir de amostras de queijos Minas Frescal artesanais e industriais comercializados na cidade de Canoas, RS.

Enterotoxinas Estafilocócicas (EE)	Linhagens de <i>S. aureus</i> isolados de queijos Minas Frescal										TOTAL/%			
	Amostras Artesanais					Amostras Industriais								
	ND	%	NF	%	total %	ND	%	NF	%	total %				
A	3	10,0	2	6,7	5	16,7	1	3,3	1	3,3	2	6,7	7	11,6
B	2	6,7	1	3,3	3	10,0	2	6,7	1	3,3	3	10,0	6	10,0
C	1	3,3	1	3,3	2	6,7	0	0	0	0	0	0	2	3,3
D	1	3,3	2	6,7	3	10,0	2	6,7	0	0	2	6,7	5	8,3
E	1	3,3	0	0	1	3,3	0	0	0	0	0	0	1	1,7
A + B	1	3,3	2	6,7	3	10,0	1	3,3	0	0	1	3,3	4	6,7
B + C	1	3,3	0	0	1	3,3	0	0	0	0	0	0	1	1,7
A + B + C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
A + B + C + D	1	3,3	0	0	1	3,3	1	3,3	0	0	1	3,3	2	3,3
Subtotal	11	36,7	8	26,7	19	63,3	7	23,3	2	6,7	9	30	28	46,7
Nenhuma EE	7	23,3	4	13,3	11	36,7	16	53,3	5	16,7	21	70	32	53,3
TOTAL	18	60,0	12	40,0	30	100	23	76,6	7	23,4	30	100	60	100

ND: Número de amostras dentro do padrão estabelecido pela legislação, NF: Número de amostras fora do padrão estabelecido pela legislação.



Um subtotal de 11 (36,7%) de isolados de *S. aureus* foram produtores de enterotoxinas estafilocócicas (EE), em amostras artesanais de queijo Minas Frescal, consideradas dentro do padrão (ND) estabelecido pela legislação. Já 8 (26,7%) das amostras, que se encontraram fora do padrão (NF), apresentaram produção de toxinas. Um número menor, mas também preocupante, foi verificado entre as amostras de queijo Minas Frescal industrial, onde sete (23,3%) e dois (6,7%), respectivamente para ND e NF, positivos para a produção de EE. Esse resultado é melhor visualizado, quando se observa os gráficos da figura 1, quanto à distribuição e produção de EE.

A ocorrência de microrganismos patogênicos em queijos distribuídos para consumo, particularmente os de massa crua, tem sido alvo de intensivas pesquisas ao longo dos anos e diversos autores mostram a importância do controle da qualidade de tais produtos (Araújo *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007; Zaffarii *et al.*, 2007; Abrahão *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2008). Estudos revelam um quadro desfavorável da qualidade higiênica do queijo tipo Minas Frescal fabricado artesanalmente (Filho e Filho, 2000; Loguercio e Aleixo, 2001; Rezende *et al.*, 2005; Salotti *et al.*, 2006; Muratori *et al.*, 2007 e Zaffarii *et al.*, 2007). Porém, essa não é uma característica apenas do produto artesanal. Também foi evidenciada a ocorrência de falhas no controle da qualidade de queijos industrializados (Pereira *et al.*, 1999; Nicolau *et al.*, 2001; Almeida e Franco, 2003; Barros *et al.*, 2004; Lisita, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Salotti *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2007; Quintana e Carneiro, 2007). O grande número de amostras fora dos padrões microbiológicos ressalta a importância do cuidado higiênico-sanitário com a manipulação de alimentos.

Entre as espécies de *Staphylococcus* enterotoxigênicos coagulase positiva, *S. aureus* está mais relacionado com casos e surtos de intoxicação alimentar pela habilidade de produzir exotoxinas superantigênicas (PTSAg), como as enterotoxinas que estimulam a proliferação não-específica de células T (Dinges *et al.*, 2000).

Segundo ICMSF (1996), as condições básicas para o desenvolvimento de linhagens de *S. aureus* e a produção de toxinas variam conforme os tipos de alimento. Para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação, são necessárias  $10^5$  a  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>. Os parâmetros físicos e químicos considerados ótimos para o crescimento e a produção de enterotoxinas em queijos, em geral, são: temperatura (35° a 40° C), pH (6,0 a 7,0), atividade de água (Aa) (>0,98), concentração de sal (NaCl) (0 a 0,5%) e disponibilidade de oxigênio em torno de 5 a 20% (atmosfera aeróbica/microaerófila).

Observando a figura 1, a maior frequência enterotoxigênica ocorre entre as amostras artesanais ND, cerca de 36,7 %, e das amostras NF, 26,7 % foram produtoras de EE. O mesmo se repete com as amostras industriais, porém numa frequência bem reduzida, os percentuais de produção de EE, para as amostras ND, foram de 23,3 % contra 6,7 % para as amostras NF.

De acordo com esses resultados, torna-se evidente a necessidade de implantar e estender um sistema de exigências legais, recomendações técnicas de boas práticas agropecuárias e de fabricação (BPA e BPF), rotulagem, transporte e armazenamento, para aqueles sistemas de produção artesanal, fabricação e/ou que manipulam alimento de origem animal ou vegetal. E quanto aos produtos industrializados, cabe aos serviços de inspeção correspondentes a fiscalização em toda a cadeia láctea.

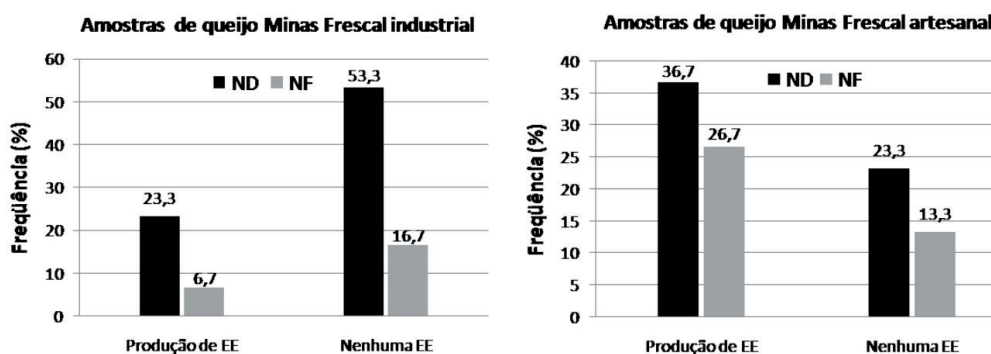


Figura 1. Produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE) de acordo com os tipos de amostras de queijo. ND: número de amostras dentro do padrão estabelecido pela legislação, NF: número de amostras fora do padrão estabelecido pela legislação.

O princípio básico da implementação dos sistemas de garantia de qualidade em unidades de processamento está descrito em “Recomendações Básicas para a aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar” (Nascimento Neto, 2006).

### Produção de Toxinas

A produção de toxinas por linhagens de *S. aureus* isoladas de queijos de fabricação artesanal revelou similaridades com alguns resultados descritos na literatura. Observando a figura 2, verifica-se que a EEA é prevalente sobre as demais, resultados também descritos por Sabioni *et al.* (1988) e Nicolau *et al.* (2001). As demais toxinas apresentaram uma frequência variável, onde a EEB foi a segunda mais detectada, seguida por EED, EEC e com a menor frequência a EED.

Quanto às toxinas produzidas por *S. aureus* isolados de amostras industriais, a frequência maior foi EEB seguida da EEC. Verifica-se diferença significativa ao analisar comparativamente com as toxinas de amostras artesanais, praticamente há uma inversão dos valores de frequência. Em alimentos de origem animal, crus, não industrializados ou semi-industrializados, há uma tendência de que a produção de toxinas se concentre entre os tipos B e C. As toxinas são termoestáveis e originam sintomas como vômito e diarreia, dentre outros (Borges *et al.*, 2008). É necessário menos de 1µg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica, sendo que a população de  $10^5$  UFC de *Saphylococcus/g* ou mL de alimento é necessária para provocar um quadro de intoxicação (Bergdoll, 1989).

Segundo Borges *et al.* (2008), essas variações, possivelmente, são consequências da diversidade genética que ocorre entre as linhagens e suas origens, ou seja, pertencem a diferentes microbiotas.

A maioria das linhagens envolvidas em intoxicações alimentares, envolvendo alimentos manipulados, produz EEA, sendo EEC, EEB, EED e EEE encontradas em ordem decrescente de frequência (Bergdoll, 1990).

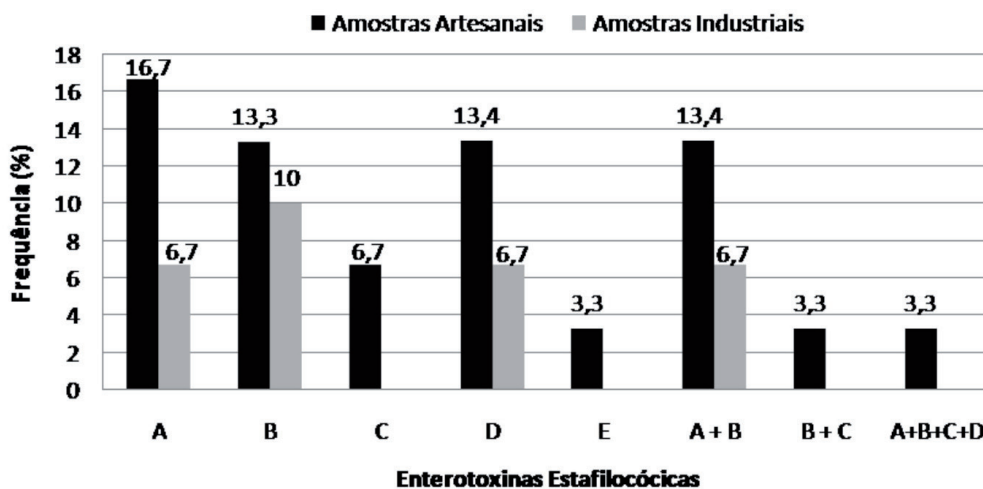


Figura 2. Tipos de enterotoxinas estafilocócicas e produzidas isoladas e em associação, por *S. aureus* proveniente de amostras de queijo Minas Frescal artesanal e industrial, na cidade de Canoas RS/Brasil.

Lamita *et al.* (2005) observaram a produção de enterotoxinas (A, B, C e D) em linhagens de *Staphylococcus* tanto coagulase positiva, como negativa. Essas linhagens foram isoladas de amostras de leite cru refrigerado, oriundo de diferentes propriedades rurais localizadas na região sudeste do Brasil. Esses autores concluíram que

a frequência de EEC e EEB é maior, seguidas de EED e EEA. Também, no mesmo trabalho, constataram maior percentual de linhagens coagulase negativa produtoras de enterotoxinas. Esse fato se torna preocupante uma vez que, para esses microrganismos, não são exigidos os testes de presença/ausência pela legislação vigente no Brasil.

Carmo *et al.* (2002) relataram a ocorrência de dois surtos de intoxicação estafilocócica causados pelo consumo de queijo Minas e leite, ocorridos em dois municípios do estado de Minas Gerais. No primeiro surto, o consumo de queijo Minas foi incriminado e envolveu 50 pessoas. As amostras de queijo e de leite cru inicial apresentaram contagens de *S. aureus* de  $2,4 \times 10^3$  a  $2,0 \times 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> e presença de enterotoxinas A, B e C. No segundo surto, o consumo de leite cru proveniente de animais com mastite (contagem de estafilococos coagulase negativa superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e presença de enterotoxinas C e D) causou a intoxicação de 328 pessoas.

Observa-se, ao longo dos anos, um crescimento significativo, em diferentes países, no número de surtos e casos esporádicos de intoxicação, atribuídos ao consumo de produtos lácteos. Na maioria das vezes, a causa está associada ao frequente consumo de queijos (Carmo *et al.*, 2002; Carmo *et al.*, 2009; OMS, 2009).

Embora a investigação seja feita de modo a detectar o alimento envolvido e o padrão de intoxicação, o tipo, bem como as associações de toxinas, raramente são investigadas. Na figura 2, a associação de EEA e EEB é a mais frequente, chegando a 13,4% nas amostras artesanais, apenas uma pequena parcela de amostras (3,3%) apresentou estafilococos produtores de três ou mais toxinas.

## CONCLUSÕES

Diante desses resultados, verificou-se que a contaminação por *S. aureus* está presente em ambos os lotes, em percentuais expressivos. Isso determina um produto de risco à saúde do consumidor, por estar fora dos padrões sanitários estabelecidos pela legislação.

A qualidade inicial do leite é a primeira condição para obter um bom queijo. Quando o número de bactérias patogênicas iniciais do leite é elevado, os processos de beneficiamento e industrialização, em geral, não são eficientes para sua destruição. O crescimento de bactérias no leite pasteurizado está relacionado com as condições em que o produto é armazenado antes de chegar aos consumidores. A manutenção desse produto em temperatura superior à indicada pelo RIISPOA pode ser fator determinante para se exceder aos limites microbiológicos aceitos.

Quando esse produto é fabricado de forma artesanal, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, entre eles os *S. aureus*, o que compromete a sua

qualidade e a segurança alimentar do consumidor. Dessa forma, práticas de higiene devem ser observadas para prevenir a possível contaminação do produto. Além disso, por não ser maturado e ser perecível, deve ser consumido rapidamente, após curta estocagem em ambiente refrigerado.

Para diminuir os riscos de contaminação na indústria, é recomendável que o leite passe por um processo de controle de pasteurização. Interliga-se a esse controle de qualidade a necessidade de que as indústrias implantem um programa de segurança alimentar do tipo Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Esse sistema, embora hoje ainda não obrigatório nas indústrias, se justifica pela necessidade de produzir alimentos mais seguros, de maneira sistematizada, estabelecendo pontos de monitoramento e garantindo assim a segurança do produto final em uma linha específica de produção.

A produção artesanal também exige atenção fiscalizadora, onde o mais importante é, antes de tudo, a orientação e o treinamento dos fabricantes, quanto aos métodos higiênico-sanitários a serem adotados no estabelecimento.

Cabe às secretarias de saúde (SES) o papel de executor da fiscalização. Entre as atribuições, esse setor tem competência de conceder e cancelar o Certificado de Cumprimento de Boas Práticas de Fabricação, interditar, como medida de vigilância sanitária, os locais de fabricação, controle, armazenamento, distribuição e venda de produtos e a prestação de serviços relativos à saúde, no caso de violação da legislação pertinente ou de risco iminente à saúde.

Portanto, faz-se necessário maior atenção das autoridades em vigilância sanitária, quanto aos estabelecimentos de produção, sejam eles industrial ou artesanal, em relação à autorização de funcionamento, à qualidade da matéria-prima, à produção, à conservação e comercialização, evitando-se assim o comprometimento da saúde do consumidor.

## AGRADECIMENTOS

A equipe agradece à FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, pelo apoio através do programa de auxílio à pesquisa (processo nº 07509698), e ao Centro Universitário La Salle/Canoas, sede da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, W. M. *et al.* 2008. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 289-296.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M., 2003. 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. 11, p. 79-85.

ARAÚJO, V. S. *et al.* 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 6, p. 1172-1177.

BARROS, P. C. O. G. *et al.* 2004. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 57-61.

BERGDOLL, M. S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: M. P. Doyle (ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, p.463-523.

BERGDOLL, M. S. 1990. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 10, p. 91-100.

BORGES, M. F. *et al.* 2008. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86.

BRANT, L. M. F.; FONSECA L. M.; SILVA M. C. C. 2007. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1570-1574.

BRASIL. 2007. Portaria N. 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico. Princípios gerais para o abastecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 182, p. 21005-21011, seção I.

BRASIL. 2003. Programa de procedimentos-padrão de higiene operacional (PPHO) nos estabelecimentos de leite e derivados. Resolução DIPOA/DAS N. 10, de 22 de maio de 2003, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 4-5, seção I.

BRASIL. 2001. Resolução-RDC N. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 7-E, p. 46-53, seção I.

BRASIL, 1997. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. Ministério da Agricultura, Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2010.



- CARMO, L. S. 2002. Intoxicação alimentar. **Revista Minas Faz Ciência**, n.11, p. 1-2. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br.htm>>. Acesso em: 09 maio 2010.
- CARMO, L. S. do *et al.* 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14.
- CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y., 2007. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262-267,
- CASTRO, V. C. *et al.* 2007. Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo minas frescal comercializado em Teresina – PI. In: ANAIS DO CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2007, João Pessoa, PB.
- CLEMENTE, M. das G.; VALLE, R. H. P. do; ABREU, L. R. de. 2003. *Staphylococcus* em queijos fabricados com leite cru e pasteurizado. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 38-39.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34.
- DUARTE, D. A. M. *et al.* 2005. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p.297-302.
- DUREK, C. M. 2005. **Verificação das boas práticas de fabricação em indústrias de leite e derivados, registrados no Serviço de Inspeção Federal – SIP**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, 83p.
- FIGUEIREDO, R. M. 1999. **SSOP - Padrões e Procedimentos Operacionais de Sanitização; PRP-Programa de Redução de Patógenos. Manual de Procedimentos e Desenvolvimento**. São Paulo: RM Figueiredo, 161 p.
- FILHO, E. S. A; FILHO, A N. 2000. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580. 225p.
- FLOWERS, R. S. *et al.*, 1992. Salmonella. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Org.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington, DC: APHA. p. 371-422.
- HOFFMAN, F. L. *et al.* 2001. Monitoramento da qualidade microbiológica do queijo tipo “Minas Frescal” fabricados artesanalmente. **Indústria de Laticínios**, v. 34, p. 71-75.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Staphylococcus aureus*. 1996. In: ICMSF. **Microorganisms in food 5: characterization of microbial pathogens**. v. 5. New York: Kluvers Academic, p. 299-333.





- PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. 2001. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 21, n. 2, p. 171-175.
- PERESI, J. T. M. *et al.* 2001. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70.
- QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. 2007. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos – GO. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8, n. 3, p. 205-211.
- REZENDE, P. L. *et al.* 2005. *Salmonella*, coliformes totais e fecais em queijo minas artesanal comercializado em feiras livres de Uberlândia-MG. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO E BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2005, Búzios, RJ, p. 413-416.
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. 2006. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272.
- SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. S. R. S.; ELIAS, A. O. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, p. 321-326.
- SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. 1998. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas-frescal. **Hig. Aliment.**, v. 12, p. 48-50.
- SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. 1988. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde Públ.**, v. 22, n. 4, p. 458-461.
- SALOTTI, B. M. *et al.* 2006. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-175.
- SILVA, I. M. M. *et al.* 2003. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 241-248.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; CUNHA NETO, A. 2002. *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 3, p. 263-271.
- STAMFORD, T. L. M. *et al.* 2006. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 41-45.

VERNOZY-ROZAND, C. *et al.* 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses. **Journal Dairy Reserch**, v. 2, p. 273–281.

ZAFFARII, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. 2007. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 862-867.