

MILENE THEREZINHA DAS DORES

**ENTEROTOXIGENICIDADE DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca UFV Campus de Rio Paranaíba**

T

D695e
2013

Dores, Milene Therezinha das, 1980-

Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de
queijo minas artesanal da canastra / Milene Therezinha das
Dores. – Viçosa, MG, 2013.

x, 66f. : il. ; 29cm.

Orientador: Célia Lucia de Luces Fontes Ferreira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Queijo-de-minas – Microbiologia. 2. Queijo-de-minas –
Análise. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 637.353

MILENE THEREZINHA DAS DORES

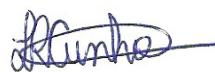
ENTEROTOXIGENICIDADE DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA CANASTRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

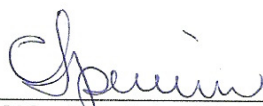
APROVADA: 21 de fevereiro de 2013.



Prof. Ítalo Tuler Perroni



Prof.ª Luciana Rodrigues da Cunha



Pesq. Cláudia Lúcia Oliveira Pinto
(Coorientadora)



Prof. Mauro Mansur Furtado
(Coorientador)



Prof.ª Célia Lucia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientadora)

Dedico este trabalho a minha família pelo apoio incondicional e amor, tenham certeza que esta conquista é de todos nós.

AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável por todas as minhas conquistas.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, carinho e incentivo durante todos os momentos em minha vida.

À Maria Clara, Kaíra e T. Augusto pela simples existência.

Ao Marcelo pelo carinho, companheirismo e amor que foram indispensáveis a cada momento e que amenizaram as dificuldades encontradas no caminho.

À Universidade Federal de Viçosa junto ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba junto ao Instituto de Ciências Agrárias pela oportunidade de concluir meu treinamento.

A FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, idealizadora deste projeto, pela sua orientação, confiança, compreensão e paciência em todas as fases deste trabalho.

A EMBRAPA Gado de leite e a Fundação Ezequiel Dias pela disponibilidade dos laboratórios em especial aos pesquisadores Dr. Edna Froeder Arcuri e Dr. Ricardo Dias pela ajuda incondicional e ensinamentos.

Ao professor Mauro Mansur Furtado e pesquisadora Cláudia Lúcia Oliveira Pinto (EPAMIG) pela coorientação e pelos conhecimentos repassados.

Aos amigos do Laboratório de culturas lácticas do DTA pelos bons momentos vividos em especial a amiga Luciana pela pelo apoio e amizade.

À Juliana pela amizade e infinita ajuda, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Às ex-estagiária e grande amiga Elisângela pelo apoio dedicação e preciosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do DTA que contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os funcionários do DTA, em especial ao Célio, Pio, Dimas, Geralda, e Vaninha pela amizade e extrema paciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

DORES, Milene Therezinha das, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2013. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Minas Artesanal da Canastra.** Orientadora: Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Cláudia Lúcia Oliveira Pinto e Mauro Mansur Furtado.

O queijo Minas artesanal é, há séculos, o único vínculo de pequenos produtores mineiros com o mercado, portanto é o que lhes garante o sustento. Estudos prévios com queijo Minas artesanais demonstraram que o *S. aureus* é a espécie que definiu o tempo mínimo de maturação necessário para se obter segurança microbiológica, uma vez que, permaneceu em altas contagens por um longo período durante a maturação. Considerando-se que a presença de *S. aureus* é comum nesse tipo de queijo, o presente estudo objetivou-se avaliar a presença de *S. aureus* enterotoxigênico no fermento endógeno e em queijos Minas artesanal da região da Serra da Canastra. Foram coletadas 16 amostras de fermento endógeno e de queijo em dois períodos do ano, chuvoso e seca. A contagem e o isolamento de *S. aureus* foram realizados em placas Petrifilm™ - *Rapid S. aureus*. Para a detecção de enterotoxinas em queijo utilizou-se o método de Sensibilidade Ótima em Placas (OSP) para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED e o método ELFA-VIDAS® *Staph enterotoxina II*, para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE. Estirpes de *S. aureus* foram testadas quanto à capacidade de produzir enterotoxinas, usando o método de OSP e por meio da análise de PCR para os genes de enterotoxinas clássicas. As contagens de *S. aureus* nos queijos com oito dias de maturação foram superiores ao limite exigido pela legislação brasileira (2,0 log UFC.g⁻¹) e

variaram de 3,48 a 5,88 log UFC.g⁻¹ para o período chuvoso e de 3,11 a 4,60 log UFC.g⁻¹ para o período da seca. Já as contagens de *S. aureus* no fermento endógeno foram menores, variando de < 1 a 3,11 log UFC.g⁻¹. Apenas a enterotoxina SEA foi detectada pelo método OSP, estando presente em 75% das amostras de queijo. Nenhuma toxina foi detectada com o método ELFA-VIDAS, no entanto, resultados falso-negativos foram encontrados, os quais podem ser devido à presença de possíveis interferentes, como substâncias não imunológicas ligadas à matriz. Observou-se que 12,5% das estirpes isoladas produziram SEA e SEC. Ao utilizar a técnica de PCR, apenas dois isolados genes de enterotoxinas (*seb* e *seg*). Embora aos resultados entre as metodológicas imunológicas e moleculares tenha sido contraditórias, as estirpes de *S.aureus* isoladas do fermento endógeno e do QMA apresentaram baixo potencial enterotoxinogênico. No entanto, os resultados encontrados neste trabalho evidência a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de métodos analíticos que não apresentem interferência nos resultados e que incluam, também, as enterotoxinas não-clássicas.

ABSTRACT

DORES, Milene Therezinha das, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2013. **Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated of the Minas Artisanal Cheese from Canastra.** Adviser: Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira. Co-advisers: Cláudia Lúcia Oliveira Pinto and Mauro Mansur Furtado.

The Minas artisanal cheese is, for centuries, the only link small producers with the market, so it is what gives them survival. Previous studies have shown that cheese Minas artisanal *S. aureus* is the species that define the minimum time needed to obtain ripening microbiological safety, since, in high counts remained for a long period during ripening. Considering that the presence of *S. aureus* is common in this type of cheese, the present study aimed to evaluate the presence of *S. aureus* enterotoxigenic endogenous starter in Minas artisanal cheeses and the Serra da Canastra. We collected 16 samples of endogenous starter and cheese in two seasons, rainy and dry. The counting and the isolation of *S. aureus* were performed on plate count Petrifilm™ - *Rapids S. aureus*. For detection of enterotoxins in cheese it was used the method in Optimal Sensitivity plates (OSP) for enterotoxinas SEA, SEB, SEC and SED and methods ELFA-VIDAS® *Staph enterotoxina II* for enterotoxins SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED and SEE. Strains *S. aureus* were tested for their ability to produce enterotoxins, using the OSP and by PCR analysis for the classical enterotoxin genes. The counts of *S. aureus* in cheese ripening eight days were above the limit required by Brazilian law $-2.0 \log \text{CFU g}^{-1}$, and ranged from 3.48 to 5.88 $\log \text{CFU g}^{-1}$ for rainy season and from 3.11 to 4.60 $\log \text{CFU g}^{-1}$ for the period of drought. Since counts of *S. aureus* in endogenous leaven were lower, ranging from <1 to 3.11 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Only the enterotoxin SEA was detected by the OSP method, being present in 75% of samples of cheese. No toxin was

detected with the method ELFA-VIDAS however false negative results were found, which may be due to the presence of possible interferences, such as substances not related to immune matrix. It was observed that 12.5% of the strains isolated produced SEA and SEC. When using the PCR assay, one isolate showed enterotoxin gene. When using the PCR assay, only two isolates enterotoxin genes (*seb* e *seg*). Although the results of the immunological and molecular methodology have been contradictory, *S. aureus* strains isolated from the endogenous starter and QMA showed low potential enterotoxinogênico. However, the findings in this study highlight the need for further studies to develop analytical methods that do not show interference in the results and include also the non-classical enterotoxins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Históricos da produção de queijos artesanais	3
2.2. Queijos Artesanais no Brasil e no mundo	4
2.3. Queijos Minas Artesanais.....	6
2.4. Aspectos legais da fabricação de QMA.....	8
2.5. Aspectos relacionados à segurança microbiológica do QMA	10
2.5.1. Qualidade do leite utilizado na fabricação dos QMA.....	11
2.5.2. Boas Práticas de Fabricação	11
2.5.3. Microbiota endógena do leite cru: o papel das bactérias lácticas.....	12
2.5.4. Tempo e temperatura de maturação.....	14
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.6.1. Caracterização das enterotoxinas estafilocócicas.....	17
2.6.2. Fatores que interferem na inibição da síntese de enterotoxina estafilocócica.....	17
2.6.3. Métodos de detecção de enterotoxinas.....	19
2.7. Surtos de intoxicação estafilocócica associados ao consumo de produtos lácteos	21
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> em QMA.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Delineamento Experimental.....	24
3.2. Avaliação das características físico-químicas do fermento endógeno e do QMA.....	25
3.3. Contagem e isolamentos de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.4. Caracterização do perfil bioquímicos	25
3.4. Detecção de enterotoxina estafilocócicas no QMA	26

3.4.1. Teste Qualitativo Imunoenzimático ELFA-VIDAS [®]	26
3.4.2. Método de Sensibilidade Ótima	26
3.5. Indução da produção de enterotoxina estafilocócica pelas estirpes de <i>S. aureus</i>	27
3.6. Determinação da presença dos genes das enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE SEG) nos isolado de <i>S. aureus</i>	28
3.6.2. Amplificação por PCR utilizado os iniciadores específicos para a detecção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> e <i>seg</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Características físico-químicas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra	30
4.2. Enumeração de <i>S. aureus</i> em fermento endógeno e em queijo Minas artesanal da Canastra	32
4.3. Detecção de enterotoxina nas amostras de queijo Minas artesanal da Canastra	36
4.4. Isolamento e caracterização do perfil bioquímico das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra	39
4.5. Capacidade de produção de enterotoxina <i>in vitro</i> pelas estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra	40
4.6. Identificação dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> e <i>seg</i> das estirpes de <i>S. aureus</i> isoladas.....	42
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS	60

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, responsável pela geração de renda de um grande número de pequenos produtores rurais. Sua produção centenária caracteriza-se pela utilização de leite cru recém-ordenhado e de fermento endógeno natural, originado da batelada do dia, adicionado para direcionar a fermentação. As principais espécies que compõem este fermento endógeno são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, com contagem de, aproximadamente, $8 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ (BORELLI et al., 2006; NÓBREGA et al., 2008).

Os queijos artesanais têm sido objetos de pesquisa associado a sua importância econômica e social, e principalmente às constantes reformulações da legislação brasileira na tentativa de adequar as especificidades deste produto às regulamentações. A regulamentação mais recente, publicada em 16 de dezembro de 2011 no diário Oficial da União, foi a Instrução Normativa n°. 57. A nova regra define que a produção de queijos artesanais com maturação inferior a 60 dias é restrita às queijarias situadas em regiões certificadas ou tradicionalmente reconhecidas e em propriedade produtora de leite cru. No entanto, ainda não existem pesquisas conclusivas de que queijos artesanais produzidos de acordo com as normas vigentes da legislação brasileira não apresentam risco para o consumidor, uma vez que queijos de produtores cadastrados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) apresentaram baixa qualidade microbiológica quando pesquisados.

Por ter sua produção totalmente artesanal, os queijos mineiros muitas vezes não seguem os padrões de segurança alimentar exigido, Assim esse

produto podem veicular micro-organismos e substâncias tóxicas e, assim, representar um risco à saúde pública. Altas contagens de patógenos muitas vezes acima dos valores permitidos pela legislação são os resultados mais comuns encontrados na literatura relacionados ao queijo artesanal mineiro ainda fresco. Esta baixa qualidade microbiológica normalmente está associada às más condições higiênicas sanitárias e à manipulação inadequada durante o processamento.

Staphylococcus sp. é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por causar surtos de intoxicação alimentar. Entre os alimentos envolvidos nestes surtos de intoxicação, o leite cru e os queijos são os produtos lácteos mais incriminados, sendo *S. aureus* o agente etiológico mais frequente nas investigações epidemiológicas (DE BUYSER et al., 2001; IKEDA et al., 2005).

Determinações microbiológicas em queijos artesanais têm indicado a presença de *S.aureus* em concentrações muitas vezes acima daquelas permitidas pela legislação (PINTO, 2004; ARAÚJO et al., 2005; BORELLI; MARTINS 2006; DORES, 2007). Por outro lado, existem poucos relatos ou notificações de toxinfecções estafilocócicas relacionadas ao seu consumo.

Dores (2013) analisou o período mínimo de maturação necessário para atingir a segurança microbiológica em queijos Minas artesanal da Canastra e constatou que *S. aureus* foi a espécie que definiu o período de maturação, por permanecer por mais tempo com contagens acima da permitida pela legislação brasileira, $2,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ (Lei Estadual nº. 14.185, de janeiro de 2002 (alterado pelo decreto nº 44.864, de agosto de 2008). O autor verificou a presença desse micro-organismo após 64 dias de maturação a 10 °C e estimou que seriam necessários 84 dias de maturação à mesma temperatura para redução aos níveis aceitáveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins (2006) ao acompanhar a maturação dos queijos artesanais do Serro.

Considerando-se que a presença de *S. aureus* é comum em queijos Minas artesanal e a inexistência de relatos de surtos de intoxicação estafilocócica ao seu consumo, objetivou-se, neste estudo, avaliar a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos no fermento endógeno e em queijos Minas artesanal da região da Serra da Canastra.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Históricos da produção de queijos artesanais

Queijo é o nome genérico dado a um grupo de alimentos fermentados à base de leite e produzido em uma ampla variedade de sabores e formas em todo o mundo. Embora o objetivo primordial do queijo seja conservar os principais constituintes do leite, ele evoluiu, tornando-se um alimento da alta gastronomia com qualidades peculiares, além de ser altamente nutritivo (FOX; MCSWEENEY, 2004).

Embora existam muitas teorias sobre a origem do queijo – e muitas lendas também –, dois dados importantes permanecem sem explicação: a origem e quando exatamente esse alimento surgiu. Com relação ao tempo, sabe-se que já havia queijos na Mesopotâmia por volta de 6000 aC (LEANDRO, 2008). A Bíblia cita este produto em mais de uma passagem do Velho Testamento e, no antigo Egito, murais em tumbas mostram cenas de fabricação de queijo. Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram, no leite e no queijo, fonte importante de sua alimentação. Isso foi possível porque o fértil vale do Nilo possuía ricas pastagens importantes para a alimentação do gado (FOX; MCSWEENEY, 2004; LEANDRO, 2008). Uma das lendas que envolvem a produção de queijos atribui a um nômade árabe que, em uma de suas jornadas pelo deserto, teria levado como alimento um pouco de leite em um cantil feito de estômago seco de carneiro. Após certo tempo o leite teria se tornado sólido e com sabor agradável (PERRY, 2004).

O queijo primitivo era apenas o leite coagulado, desprovido de soro e sal, mas foi durante o Império Romano que os queijos atingiram o alto padrão de aperfeiçoamento. A técnica de maturação já havia sido desenvolvida e as casas possuíam um espaço próprio para a fabricação e a “cura” dos queijos. Na Idade Média, os monges cristãos transformaram a fabricação de queijos em uma verdadeira arte, introduzindo muitas das variedades consumidas ainda hoje.

Em 1267, foi fundada na França a primeira *fruitières*, ancestral das cooperativas laticinistas, que produzia os queijos Beaufort, Emmenthal e Comté. No século XIX, iniciou-se a produção em massa de queijos, mas somente na segunda metade do século XIX ela realmente alavancou. Isso aconteceu quando Louis Pasteur descobriu que as fermentações que determinavam os diversos tipos de queijos não eram próprias do leite, mas sim provocadas por organismos microscopicamente vivos. Essa descoberta possibilitou o isolamento e a seleção desses micro-organismos, permitindo que os queijos fossem fabricados durante todo o ano e com diferentes características. Além disso, tal descoberta foi o princípio da era industrial queijeira e o fator mais importante para a rápida disseminação do queijo pelo mundo. Os métodos artesanais, no entanto, não desapareceram por completo e ainda são empregados na fabricação de muitos queijos, bastante valorizados pela sua raridade e personalidade, além de retratar a história de um povo (LEANDRO, 2008).

2.2. Queijos Artesanais no Brasil e no mundo

Atualmente mais de 1.000 variedades de queijos são fabricadas no mundo, com uma produção que excede 14 milhões de toneladas por ano. A União Europeia é a maior produtora e consumidora mundial de queijos, sendo que em 2011, produziu cerca de 7,0 milhões de toneladas, o que corresponde a cerca de um terço de todo o leite produzido (USDA, 2012). Desse total, aproximadamente 700.000 toneladas do produto artesanal são produzidas anualmente. Em virtude da produção em grande escala e das vastas áreas de produção, os queijos artesanais europeus têm grande importância social e

econômica em vários países (MCSWEENEY et al., 2004; LIMA FILHO; POMBO, 2010).

A França fabrica cerca de 400 variedades de queijos e representa o terceiro maior produtor, com 1,9 milhão de toneladas em 2011, depois da Alemanha, com 2 milhões de toneladas, e dos Estados Unidos, com 4,7 milhões por ano. O consumo per capita é de 23 kg/ano, não sendo superado por nenhum outro país (USDA, 2012). Dentre os queijos artesanais franceses, destacam-se o Roquefort, produzido com leite de ovelha e maturado por pelo menos três meses em cavernas naturais, o Camembert e o Brie. A Itália ocupa o terceiro lugar na variedade de queijos fabricados na Europa. Cerca de 50% do leite produzido em território italiano é direcionado para fabricação de queijos, dentre eles o Parmigiano-Reggiano que é o mais vendido no mundo, produzido na região de Emília-Romanha, na Itália Central (ZANONNI, 2010).

No Brasil, a origem do queijo data do período colonial, em meados do século XVIII, época da mineração do ouro, quando os portugueses trouxeram para o Estado de Minas Gerais uma legião de garimpeiros que fabricavam o queijo para consumo próprio, na tentativa de imitar o famoso queijo português Serra da Estrela. Diferenças ambientais como clima, relevo e pastagens, além de ingredientes adaptados da própria região, como o tipo de coalho e fermentos utilizados, diferiram muito o queijo Minas do queijo Serra da Estrela. Atualmente, o queijo Minas artesanal é um alimento definitivamente incorporado no cardápio dos brasileiros.

De acordo com dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), na última década a produção de queijos no Brasil cresceu a uma taxa de 5% ao ano, o que culminou na produção de quase 700 mil toneladas em 2011. No entanto, as estatísticas sobre a produção e o consumo de queijos artesanais brasileiros ainda são escassas; estima-se que o segmento de queijos artesanais no País represente 40% do volume total de queijos produzidos. Dentre os vários queijos produzidos artesanalmente, destacam-se aqueles que já se tornaram conhecidos como típicos de determinadas regiões ou estados e/ ou cujos nomes são associados a um tipo de queijo específico. Assim, a denominação dos queijos muitas vezes é ligada ao nome do município de sua origem ou ao seu local de maior produção. As principais regiões produtoras e os respectivos queijos artesanais são: i) o queijo Minas, produzido no Estado de Minas Gerais; ii) o queijo de coalho e o

queijo de manteiga, produzidos na Região Nordeste; iii) o queijo Serrano e o queijo Colonial, produzidos na Região Sul; e iv) o queijo Caipira, produzido no Estado do Mato Grosso do Sul. Em Minas Gerais há, ainda, a produção do queijo parmesão artesanal, na região do Suaçuí, e a produção de mussarela cabacinha, no norte do estado (SILVA, 2007).

2.3. Queijos Minas Artesanais

Produzido a partir de leite cru, seu modo de fabricação até hoje faz parte da cultura de um povo e constitui um patrimônio a ser preservado, como um testemunho do passado e de uma maneira de viver (MINISTÉRIO DA CULTURA, DECRETO n.º. 3.551, de 4 de agosto de 2000). No Estado de Minas Gerais, esta atividade artesanal é, comprovadamente, geradora de renda para as famílias que vivem da agricultura familiar e está presente em mais de 600 dos 853 municípios do estado. Os queijos Minas artesanais (QMA) fabricados diretamente na fazenda a partir de leite cru representam mais de 29 mil toneladas/ano e mantêm na atividade mais de 25 mil produtores. Destes, 9.445 são produtores rurais das cinco principais regiões tradicionais (EMATER, 2009 [n.p.]): Serro, Cerrado, Araxá, Serra da Canastra e Campos das Vertentes, como indicado na Figura 1.

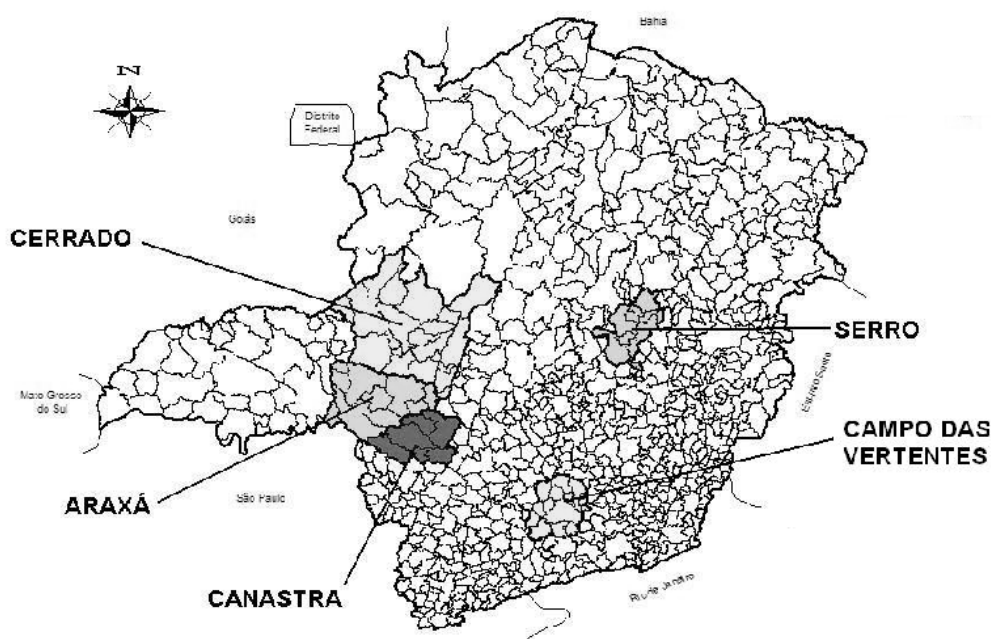
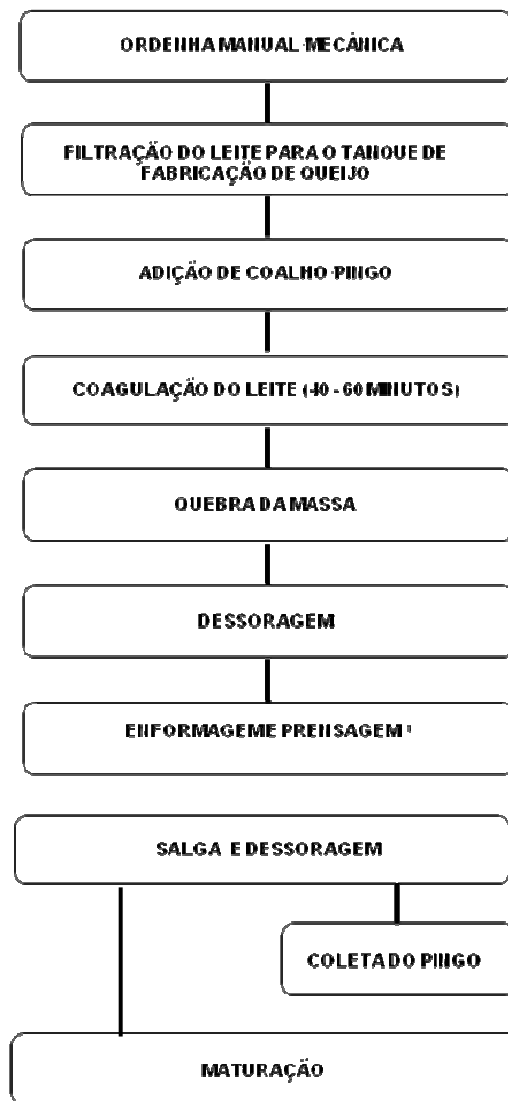


Figura 1 – Regiões tradicionalmente produtoras de queijo Minas artesanais
Fonte: Emater (2003).

A região de Campos das Vertentes foi identificada oficialmente como produtora de QMA, em 2009 (IMA, 2009), entretanto, as informações sobre essa produção são ainda escassas.

Ao analisar os dois últimos censos sobre a produção de QMA no Estado de Minas Gerais realizados pela Emater, em 2003 e 2008, percebe-se um decréscimo de 16% do número de produtores e de 22% da produção total de QMA. Este fato foi, provavelmente, ocasionado pela baixa valorização do produto, pelo aumento das exigências fiscais, aliado à ausência de implementação de políticas públicas voltadas para o setor e pela transferência da produção para a entrega do leite fluido.

Os queijos Minas artesanais do Estado de Minas Gerais são fabricados basicamente com a mesma tecnologia. Estudos demonstram que a principal diferença entre os queijos fabricados nas regiões de Araxá, da Canastra, do Cerrado e do Serro está no fato de, na região do Serro, a prensagem manual ser realizada sem o auxílio de tecido, como nas outras três regiões (EMATER, 2003; ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2006; DORES, 2013). Porém, as características finais do queijo variam conforme a região do estado onde é produzido. Além do coalho e do sal, os produtores artesanais utilizam um fermento endógeno, como coadjuvante à produção do queijo. Diariamente, após enformagem e salga do queijo, parte do soro eliminado é coletada e adicionada à produção subsequente. Esse fermento endógeno, comumente conhecido como “pingo”, contém diversos grupos microbianos que direcionam a fermentação e maturação do queijo (NÓBREGA, 2007). Essa prática insere uma microbiota diversificada no produto, representativa da região na qual o produto é fabricado, e confere ao queijo características sensoriais diferenciadas e endêmicas. Os queijos Minas artesanais possuem formato cilíndrico e peso de, aproximadamente, 1 kg. Sua maturação é realizada à temperatura ambiente, por um período quase nunca superior a oito dias, pela grande maioria dos produtores. Na Figura 2 está representado o fluxograma de produção, com o destaque para a principal diferença em sua fabricação de acordo com a região.



¹ Realizada com o auxílio de tecido nos queijos Canastra, Araxá e Cerrado.

Figura 2 – Fluxograma do processo de fabricação do queijo Minas artesanal
 Fonte: Araújo (2004), Martins (2006) e Dores (2013).

2.4. Aspectos legais da fabricação de QMA

A primeira regulamentação sobre os queijos artesanais (QA) foi feita em 2000, por meio da Resolução nº. 7 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa regulamentação estabelece que a comercialização de queijos fabricados a partir de leite cru seria permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), para aqueles queijos com o tempo mínimo de 60 dias de maturação (BRASIL, 2000). Porém, o longo tempo de maturação imposto compromete suas características sensoriais e sua

comercialização. Assim, a falta de atendimento a essa regulamentação fez com que a comercialização do QMA fosse restrita ao Estado de Minas Gerais.

Em 2002, foi regulamentada a Lei Estadual nº. 14.185 (MINAS GERAIS, 2002), específica para QMA. Essa lei apresenta definição de fabricação, embalagem e transporte do QMA e estabelece, ainda, a obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). A elaboração dessa lei foi considerada um avanço, pois direcionou os aspectos físicos de produção do QMA. No entanto, os 60 dias de maturação e o impedimento de sua comercialização em outros estados brasileiros foram mantidos, levando o produtor mineiro a continuar comercializando sua produção em condições de clandestinidade.

A partir desse impasse, constatou-se que o QMA nunca havia sido estudado, que sua tecnologia de fabricação era desconhecida, assim como o período mínimo de maturação suficiente para que o produto fosse disponibilizado de acordo com os padrões de segurança para consumo. Os produtos disponibilizados no mercado eram consumidos com uma faixa ampla de maturação, menor do que cinco e maior do que 30 dias, no entanto, em nenhuma situação encontrava-se um QMA com 60 dias. Devido às características sensoriais desse queijo, 60 dias de maturação está além do que a tecnologia permite. O tempo de maturação de 60 dias para atender à legislação, que é a reedição do que já existia desde 1952 (Decreto nº 30.691/1952), resulta em um queijo totalmente fora das características físico-químicas e sensoriais do QMA tradicionalmente comercializado há mais de 200 anos. Essa situação estimulou a academia a estudar o processo de fabricação nas regiões envolvidas e a determinar o tempo de maturação mínimo para que os QMA pudessem ser consumidos dentro dos níveis microbiológicos definidos pela legislação. Deve-se ressaltar que esses níveis microbiológicos são aqueles indicados para queijos que apresentam baixa umidade e feitos com leite pasteurizado. Os primeiros estudos indicaram ainda dois tipos de fabricação nas quatro regiões, diferenciados pelo modo de prensagem. Nas regiões da Canastra, de Araxá e do Cerrado, o QMA é tradicionalmente prensado com auxílio de tecido, enquanto no Serro a prensagem é feita sem o tecido. Essa diferença define o tempo de maturação, assim como os aspectos sensoriais característicos do queijo produzido com os dois modos de

prensagem. Dessa forma, os estudos científicos conduzidos até o momento, nas duas estações do ano (período da seca e das chuvas), indicaram para a região do Serro uma maturação mínima de 17 dias (MARTINS, 2006) e no QMA das outras três regiões de 22 dias (DORES, 2013). Outro aspecto observado nas regiões foi o desconhecimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) pela maioria dos produtores, assim como da necessidade de adequação física das unidades produtoras. Essas inadequações refletiam na qualidade da grande maioria dos produtos comercializados.

Com base em dados restritos sobre a maturação e muitos questionamentos, o Ministério da Agricultura regulamentou a Instrução Normativa (IN) nº. 57, publicada em 16 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011). De acordo com a Secretaria de Agricultura do Estado de Minas Gerais, essa IN tem como objetivo viabilizar a saída do mercado informal sem excluir agricultores e sem descaracterizar o QMA. A nova regra permite a comercialização de queijos artesanais com maturação inferior a 60 dias, contudo, a produção fica restrita a queijarias situadas em regiões certificadas ou tradicionalmente reconhecidas e na unidade produtora de leite cru. Assim, o período de maturação inferior a 60 dias será definido por pesquisas e estudos específicos, que deverão ser avaliados por comitês técnico-científicos designados pelo MAPA. No entanto, a regulamentação ainda traz questionamentos, pois não especifica como e quando serão feitos os estudos para definir o período de maturação dos queijos produzidos com leite cru. Outro aspecto é o fato de os comitês técnico-científicos, até o momento, não se encontrarem instituídos.

2.5. Aspectos relacionados à segurança microbiológica do QMA

Existe um conjunto de fatores característicos do QMA e do seu processo de fabricação que desempenha papel de destaque no controle da microbiota indesejável e que é importante para a segurança de consumo desses queijos. Entre esses fatores destacam-se: i) a qualidade da matéria-prima; ii) a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF); iii) a presença de uma microbiota endógena rica em bactérias lácticas, presentes tanto no leite cru como no fermento endógeno, importante no direcionamento das características

sensoriais e de segurança para o produto final; e iv) a temperatura e o tempo de maturação.

2.5.1. Qualidade do leite utilizado na fabricação dos QMA

A qualidade da matéria-prima utilizada para produção de QMA é fundamental para a qualidade do produto final. Os fatores importantes para a qualidade microbiológica da matéria-prima estão relacionados principalmente à saúde do rebanho, que deve ser submetido a um controle rigoroso, acompanhado por um médico veterinário; à adoção de BPF; ao treinamento dos manipuladores; e ao acompanhamento da qualidade dos queijos produzidos nessas regiões. Esse acompanhamento deve ser interativo, uma vez que ao manipulador interessa saber onde pode e deve melhorar.

No Brasil, o leite in natura não é considerado de boa qualidade microbiológica, portanto, os cuidados durante as etapas de fabricação dos QMA devem ser redobrados e a maturação desses produtos deve ser mandatória, pois é somente pela maturação que esses queijos se tornarão seguros para o consumo.

Em países da Europa, onde o agricultor familiar é valorizado pela sua dedicação aos produtos artesanais, os cuidados básicos com o rebanho, essenciais para que os produtos cheguem à mesa do consumidor com qualidade, são subsidiados (PITOMBO, 2008). Para que haja sucesso nas medidas governamentais, que têm acenado apoio às práticas artesanais, os responsáveis por essas medidas deverão repensar e considerar ações nesse sentido. Vale ressaltar que a qualidade do leite é fundamental e que qualquer ação ao longo da cadeia que desconsiderar a qualidade inicial dessa matéria-prima irá comprometer o produto final.

2.5.2. Boas Práticas de Fabricação

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) são um conjunto de normas empregadas em produtos, processos, serviços e edificações, visando a promoção e a certificação da qualidade e da segurança do alimento (BRASIL, 1997). A utilização das BPF por produtores rurais é fundamental para melhoria do ambiente e da manutenção dos recursos naturais, além de garantir produtos

de padrão mais elevado, aumentando a segurança e a qualidade de vida das pessoas que os consomem.

Para produção do QMA, as BPF são abordadas em três portarias promulgadas pelo IMA: Portaria nº. 517, de 14 de junho de 2002, que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de QMA; Portaria nº. 518, de 14 de junho de 2002, que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, dos materiais e dos equipamentos para fabricação do QMA; e Portaria nº. 523, de 23 de julho de 2002, que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e fabricação (IMA, 2002).

Diagnósticos sobre as condições físicas e as BPF das regiões produtoras de QMA (ARAÚJO, 2004; MARTINS, 2006; PINTO et al., 2009) indicaram a necessidade de adequações estruturais das propriedades e das BPF para melhorar a qualidade dos queijos produzidos nessas regiões. Os autores constataram a não conformidade e a contaminação microbiana no leite cru em um grande número de propriedades rurais, assim como no queijo recém-produzido e na água de consumo. Além disso, as condições físicas exigiam cuidados especiais. Intervenções nesses aspectos foram consideradas prioritárias para propiciar um queijo maturado com qualidade, dentro dos prazos definidos.

2.5.3. Microbiota endógena do leite cru: o papel das bactérias lácticas

O grupo das BAL compõe-se de gêneros microbianos que apresentam algumas características fenotípicas comuns, como: são cocos ou bacilos gram-positivos, catalase negativos e não esporulam. No entanto, a principal característica comum é a capacidade de fermentar açúcar, o que garante a esse grupo a função tecnológica, ou seja, o desenvolvimento de *flavor*, aroma e textura e a capacidade de promover a conservação de alimentos, associada à diminuição do pH, consequência da produção de ácido orgânico e da produção de agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas (JAY, 2005). A combinação desses fatores limita a multiplicação microbiana indesejável. Portanto, as BAL desempenham papel importante na segurança microbiológica dos alimentos.

Uma característica peculiar na produção de QMA é que, normalmente, não são utilizadas culturas iniciadoras comerciais, sendo este papel

desempenhado pela microbiota láctica proveniente do ambiente, do leite cru e do fermento endógeno, tradicionalmente conhecido como pingo nas regiões produtoras desse queijo. Dentre os diferentes grupos microbianos presentes no leite cru e no fermento endógeno, o mais conhecido e estudado é o das bactérias do ácido láctico (BAL), sendo os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* os mais encontrados nesse ambiente.

A composição do fermento endógeno é variável e parece ser influenciada pelo meio ambiente, pelo sistema de ordenha, pela tecnologia empregada na fabricação do queijo e pela época do ano (BORELLI, 2006; NÓBREGA, 2007). No fermento endógeno usado para produção do QMA na Serra da Canastra, as BAL predominantes pertencem ao gênero *Lactococcus*/*Streptococcus* (NÓBREGA, 2007) e *Lactobacillus*, sendo as espécies *L. plantarum* e *L. casei* as que predominam nos queijos produzidos na mesma região (BORELLI, 2006), o que pode ser constatado no Quadro 1. Já no fermento endógeno proveniente da região do Serro, os gêneros predominantes são *Lactococcus* e *Streptococcus* (LEITE, 1993).

Quadro 1 – Perfil das BAL encontradas no fermento endógeno utilizado na fabricação do QMA na região da Serra da Canastra

Grupos Microbianos	Contagens (log UFC.mL ⁻¹)
<i>Lactococcus</i> / <i>Streptococcus</i>	7,07
<i>Enterococcus</i>	
<i>E. faecalis</i>	6,79
<i>Lactobacillus</i>	
<i>L. plantarum</i>	9,00
<i>L. casei</i>	7,41
<i>Leuconostoc</i>	6,00

Fonte: Borelli (2006) e Nóbrega (2007).

O gênero *Lactococcus* também tem sido considerado predominante em vários queijos artesanais produzidos em outros países, como nos queijos Ibores, Roncal e Idiazábal (ARIZCUN et al., 1997; MAS et al., 2002), Peñamellera (ESTEPAR et al., 1999), Dulce, Telemea e Urda (ZAMFIR et al., 2005), Manchego (BALESTEROS, 2006), Casín (ALEGRÍA et al., 2009) e São Jorge (KONGO et al., 2009). Além da verificação da presença do gênero *Lactococcus* na maioria desses queijos, foram encontradas predominando espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e

Streptococcus. Embora a importância da diversidade microbiana tenha sido demonstrada nos QA produzidos em outros países, no Brasil são escassos os estudos sobre essa diversidade (NÓBREGA, 2007).

2.5.4. Tempo e temperatura de maturação

Os QMA, quando comercializados sem maturação, não apresentam qualidade microbiológica adequada, portanto, podem se tornar um risco para a saúde do consumidor (MARTINS, 2006; DORES, 2013). Uma das formas de melhorar a qualidade microbiológica de um queijo, mesmo diante de uma alta contagem inicial de patógenos, é a maturação, uma vez que ela favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos, considerados fundamentais para a estabilidade e segurança do queijo (BERESFORD, 2001).

A maturação corresponde à fase de complexas transformações bioquímicas, que se processam tanto na periferia como no interior da massa, sob a ação de enzimas, na sua maioria de origem microbiana (MCSWEENEY, 2004). Os fatores que mais afetam o crescimento dos micro-organismos no queijo durante a maturação são temperatura (T), potencial redox (Eh), atividade de água (Aw) e pH (FERREIRA, 2004). Além dos fatores físico-químicos, a atividade antimicrobiana de bactérias lácticas diante de micro-organismos patogênicos e deterioradores será discutida posteriormente.

Aliada à maturação, a temperatura em que esta ocorre é de extrema importância para o direcionamento da microbiota contaminante. Sabe-se que em QA a temperatura ambiente leva à fermentação desejável, o que favorece a fermentação láctica (MARTINS, 2006; DORES, 2013). O QMA somente deve ser submetido à temperatura de refrigeração após ter sido maturado. A refrigeração inibe bactérias do ácido láctico (BAL) e, conseqüentemente, leva à maturação inadequada, se essa refrigeração for antecipada. Sendo a maturação o processo de segurança dos queijos produzidos com leite cru, a inibição de BAL irá favorecer a manutenção de micro-organismos indesejáveis, como deterioradores e patogênicos potencialmente presentes no leite cru.

Na literatura internacional, várias são as publicações sobre QA e o papel da maturação na segurança desses queijos (MANOLOPOULOU et al., 2003; FLÓREZ, 2006; KONGO et al., 2009; BERTOLINO, 2011). Já no Brasil, poucas são as pesquisas sobre o assunto. Martins (2006) e Dores (2013)

acompanharam o processo de maturação de QMA produzidos no Serro e na Canastra, respectivamente. Os autores avaliaram o processo de maturação desses queijos semanalmente, durante 64 dias, em duas temperaturas de armazenamento, ambiente ($25^{\circ}\text{C}\pm 2$) e refrigeração ($10^{\circ}\text{C} \pm 2$). A maturação à temperatura ambiente foi decisiva para atender aos aspectos microbiológicos indicados pela legislação brasileira. Dessa forma, ficou definido que aos 22 dias de maturação o queijo Canastra atinge os limites de segurança microbiológica, ao passo que na região do Serro esses limites são atingidos mais precocemente, aos 17 dias (Tabela 1). Essa diferença resulta basicamente do processo de prensagem da massa, que permite maior concentração de lactose. Essa fonte de energia está em maior concentração nos queijos prensados sem tecido, pois permite maior produção de ácido pelas BAL, o que desfavorece o desenvolvimento de patógenos (Quadro 2).

Quadro 2 – Estimativa do período mínimo de maturação à temperatura ambiente (25°C) e de refrigeração (10°C) dos queijos Canastra e Serro, de acordo com as exigências microbiológicas estabelecidas pela legislação vigente

Contagens	Temperatura	Legislação Estadual (Lei nº 14.185/2002)	
		Canastra	Serro
Coliformes a 30°C	Ambiente	10 dias	13 dias
	Refrigerado	35 dias	28 dias
<i>E. coli</i>	Ambiente	13 dias	17 dias
	Refrigerado	32 dias	25 dias
<i>S. aureus</i>	Ambiente	22 dias	17 dias
	Refrigerado	84 dias	63 dias

Fonte: Martins (2006) e Dores (2013).

Embora não conste na Tabela 4, a maturação à temperatura ambiente também foi decisiva para inibição de *Salmonella* spp. em queijos do Serro com 15 dias de maturação, ao passo que não foi constatada a presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras. Esses gêneros não foram encontrados nas amostras do queijo da Canastra.

2.6. *Staphylococcus aureus*

Espécies estafilocócicas estão entre os principais patógenos humanos veiculados por alimentos. Produzem uma ampla variedade de enterotoxinas potencialmente patogênicas para o homem e são responsáveis por grande

parte dos surtos de origem alimentar no Brasil e no mundo (DE BUYSER et al., 2001; CARMO et al., 2002).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococaceae* e, atualmente, segundo Euzéby (2012), há citação de 47 espécies e 24 subespécies no gênero *Staphylococcus*, sendo a espécie *S. aureus* o principal patógeno. A habilidade de produzir coagulase divide as espécies em dois grupos: as espécies coagulase positivas, incluindo *S. aureus* subsp. *aureus*; *S. aureus* subsp. *anaerobius*; *S. hyicus*; *S. lutrae*; *S. intermedius*; *S. pseudointermedius*; *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. delphini* e, os estafilococos coagulase negativos. A espécie *S. hyicus* é, variavelmente coagulase positiva e, frequentemente, incluída como coagulase negativa.

A intoxicação causada por *S. aureus* manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. Franco e Landgraf (2008) relataram que não existe uma concordância sobre a dose infectante de toxina capaz de causar sintomas em seres humanos, porém, de maneira geral, estima-se que esteja entre 0,015 µg e 0,375 µg de enterotoxina por quilo de peso corpóreo. Lamaita et al. (2005) descreveram que é necessário menos que 1µg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica, sendo que a população de 10^5 UFC.g⁻¹ (ou UFC.mL⁻¹) de estafilococos/g ou mL de alimento é considerada suficiente para provocar um quadro de intoxicação, enquanto que Jay (2005) relatou que 200 ng seriam suficientes para causar a enfermidade.

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que o *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (CARMO, 2002; LOIR et al., 2003). Para Peresi et al. (2004) e Pelisser et al. (2009), alimentos submetidos à extensa manipulação e aqueles mantidos à temperatura ambiente por longos períodos estão entre os mais relacionados à ocorrência de surtos. Associado à intensa manipulação e ao fato de serem produzidos com leite cru, os QA são alimentos propensos à presença de *S. aureus* e suas enterotoxinas (Tabela 2). Trabalhos com queijos artesanais têm indicado a presença de *S. aureus* em níveis muitas vezes acima dos permitidos pela legislação (PINTO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005; BORELLI; MARTINS, 2006; DORES, 2013). Por outro lado, existem poucos relatos ou notificações de surtos de toxinfecções estafilocócicas relacionadas ao seu consumo.

2.6.1. Caracterização das enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais (BALABAN et al., 2000). Essas constituem um grupo de proteínas de cadeia simples de baixa massa molar. Os aminoácidos que as compõem são similares em alguns aspectos, como: alto teor de lisina, ácido aspártico e tirosina. As SE são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. Já foram descritos 22 tipos de enterotoxinas distintas (BALABAN et al., 2000; LOIR et al., 2003). As suas sequências já foram clonadas para a localização dos genes responsáveis pela codificação destas proteínas (BERGDOLL, 1990). Essas enterotoxinas são classificadas em clássicas SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE e não clássicas: SEG, SEH, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ e SEU (CARMO et al., 2002; ORWIN et al., 2003; SCHERRER et al., 2004; KUMAR et al., 2009).

A ingestão de SE, além de gastroenterites, pode causar baixa pressão sanguínea e edema pulmonar (BERGDOLL, 1990), embora, em casos isolados, doses agudas podem causar a morte devido a complicações (SCHERRER et al., 2004). Outro fator de virulência é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (CARDOSO, 1999). Essa toxina é provavelmente susceptível à clivagem pela pepsina, podendo ser menos estável nos intestinos em comparação com as SE (DINGES, 2000). A doença causada pela TSST-1 é aguda e caracteriza-se por febre alta, hipotensão e envolvimento de três ou mais órgãos sistêmicos (CHESNEY, 1989; BALABAN, 2000; JAY, 2005).

2.6.2. Fatores que interferem na inibição da síntese de enterotoxina estafilocócica

Outro efeito também importante para segurança do queijo artesanal é o das BAL sobre *S. aureus*. Em estudos desenvolvidos sobre a interação desses dois grupos constatou-se que a possível interferência das BAL sobre *S. aureus* varia em função de diversos fatores, como acidificação, produção de bacteriocina, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e competição nutricional (NOVICK, 2003; CHARLIER, 2009). Essa interferência pode ocorrer

em dois níveis: i) por dificultar sua fisiologia de crescimento; ou por ii) interferir na expressão dos fatores de virulência, prejudicando assim seu potencial patogênico (CHALIER, 2009).

Trabalhos com QMA têm indicado a presença de *S. aureus* em concentrações muitas vezes acima dos limites permitidos pela legislação (2,0 log UFC.g⁻¹) (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; BORELLI; MARTINS, 2006; BORELLI, 2011; DORES, 2013) e para formação de SE em quantidades suficientes para provocar intoxicações (> 10⁵ UFC.g⁻¹). No entanto, a SE não foi detectada na maioria dos trabalhos envolvendo QMA (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2006; BORELLI, 2011; DORES, 2013).

As SE são proteínas de baixo peso molecular (25,7 a 30,0 KDA), e sua produção é influenciada pela densidade populacional bacteriana, pela temperatura, pelo pH, pela Aw, pela concentração de sal, entre outros (Quadro 3). São sintetizadas durante toda a fase de crescimento dos micro-organismos, mas principalmente durante a fase exponencial (JAY, 2005).

Quadro 3 – Condições ótimas para crescimento e produção de SE em queijos

Fatores	Crescimento dos Micro-organismos	Produção de SE
Temperatura	7 – 48 °C (Ótima 36 °C)	10 - 45°C (Ótima a 37 °C)
pH	4,0 – 10 (Ótimo 6,5)	5,0 - 9,0 (Ótimo a 6,5- 7,5)
Aw	0,83-0,99 (Ótimo >0,99)	>0,90 (Ótimo a 0,99)
NaCl %	0 – 20% (Ótimo 0-4%)	0 – 10% (Ótimo 0 – 0,5%)

Fonte: Wong e Bergdoll (2002) e Franco e Landgraf (2005).

S. aureus possui o potencial de produzir toxinas em QMA, devido às suas características de maturação à temperatura ambiente (25°C), à Aw de 0,98 a 0,99, que comporta a faixa ótima de produção dessas SE, e à presença de NaCl em níveis não inibitórios de seu crescimento (1,15 a 1,75%).

A ausência de relação entre *S. aureus* e produção de SE em QMA pode estar relacionada ao efeito do pH sobre a síntese de SE. De acordo com Loir et al. (2003), a produção de SE é ideal em pH neutro, sendo o pH abaixo de 5,0 desfavorável à sua síntese. Essa interferência pode ser explicada pelo mecanismo de *quorum sensing*¹, que regula os fatores de virulência desse patógeno. Esta relação intercelular entre bactérias gram-positivas é realizada por meio da produção e liberação de peptídeos autoindutores (AIP), e a

¹ Nome dado ao mecanismo de comunicação entre as bactérias.

ativação desse fenômeno depende de uma densidade populacional elevada. O *quorum sensing* em estafilococos é influenciado pelo locus *agr*, que regula os fatores de virulência desses micro-organismos em resposta à densidade de AIP. Em ambientes onde a densidade populacional é alta, há maior concentração das AIP, que induzem à expressão das SE. No entanto, a relação entre AIP e SE é favorável em pH neutro; já em valores baixos de pH os níveis de AIP diminuem e a expressão das SE é prejudicada (SEO; BOHACH, 2010). Uma vez que o pH dos QMA é baixo, esses resultados explicam a possibilidade de se obter segurança microbiológica em QMA, mesmo havendo altas contagens de *S. aureus* no produto.

A expressão de genes de *S. aureus* em meios acidificados foi estudada por Chalier et al. (2009). De acordo com estes autores, a expressão de vários genes de *S. aureus* foi afetada em condições de pH baixo. Dentre o conjunto de genes afetados pelo ambiente encontram-se os genes de adaptação das espécies para ambientes ácidos, assim como os genes de virulência como as SE. Seo e Bohach (2010) explicam que o crescimento bacteriano em ambientes acidificados é alterado porque a maior parte da energia disponível na célula é utilizada para desacidificar o citoplasma, o que gera um gradiente de prótons por meio da membrana citoplasmática. Dessa forma, a presença de BAL pode ativar os mecanismos de adaptação, que garantem a sobrevivência do *S. aureus* em detrimento à síntese de SE (BRONNER, 2004; CHALIER, 2009).

Assim, fica evidente que na matriz do QMA feito com leite cru a microbiota láctica que predomina no início do processo tem papel relevante por causa do acúmulo de seus metabólitos na segurança desses queijos. Essa característica, aliada ao efeito Jameson, ilustra o papel da microbiota endógena com ênfase nas BAL na segurança microbiológica do QMA (JAMESON, 1962; FERREIRA; FERREIRA, 2011).

2.6.3. Métodos de detecção de enterotoxinas

Os métodos existentes para detecção de SE são classificados em biológicos e imunológicos, sendo estes últimos os de maior aplicação. Os métodos imunológicos são mais sensíveis e específicos (SU; WONG, 1997) e utilizam anticorpos monoclonais e policlonais específicos para identificação das

SE. Este método baseia-se no princípio de precipitação da reação antígeno-anticorpo. O maior problema na detecção da SE em alimentos é a pequena quantidade encontrada no alimento incriminado em surtos de intoxicação alimentar (LANCETTE et al., 2001).

O primeiro teste imunológico desenvolvido foi o método de imunodifusão baseado na reação em gel da enterotoxina com anticorpo específico, formando uma linha de precipitação. A técnica de Sensibilidade Ótima em Placas (OSP-*Optimum Sensitivity Plate*) permite a detecção de 0,5 µg/mL de SE, sendo sua sensibilidade adequada para maioria das linhagens de *Staphylococcus* spp. (ROBBINS et al., 1974; SU; WONG, 1997; PEREIRA et al., 2001; WONG; BERGDOLL, 2002), não sendo possível detectar linhagens pouco produtoras (BERGDOLL, 1990). A utilização de técnicas de produção e concentração como cellophane-over-agar pode aumentar a sensibilidade para 0,1 µg/mL (WONG; BERGDOLL, 2002). A técnica de OSP foi desenvolvida com o objetivo de promover um teste com maior sensibilidade, de maneira a não comprometer a visualização da linha de precipitação. Sabe-se que fatores como o tipo e a concentração do ágar, quantidade distribuída na placa, tamanho e localização dos poços e a concentração do antissoro e toxina podem influenciar na sensibilidade e resolução do teste (ROBBINS et al., 1974). O método de imunodifusão em microlâminas (microslide) é o mais sensível na imunodifusão em gel, tendo a capacidade de detectar de 0,05 a 0,1 µg/mL, embora apresente resultados de difícil interpretação (WONG; BERGDOLL, 2002).

Os principais métodos rápidos, disponíveis no mercado, para detecção de SE em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e em extratos de alimentos, são kits imunoenzimáticos que, em sua maioria, utilizam ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay); LA (Látex agglutination); RPLA (Reversed passive latex agglutination) e ELFA (Enzyme linked Fluorescent Assay) (PIMBLEY e PATEL, 1998). Entre os principais kits incluem-se: SET-RPLA (Oxoid); BOMMELI SET-EIA (Dr. Bommeli AG); TECRA SET-VIA (Bio-Enterprises Pty Ltd); RIDASCREEN SET (R-Biopharm GmbH); TRANSIA (Transia Dffchamb – SA) e o VIDAS[®] *Staph enterotoxin* – SET (BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France) (BRETT, 1998). O kit VIDAS[®] *Staph enterotoxin* (SET) é um ensaio imunoenzimático que utiliza ELFA para a detecção simultânea de SEA, SEB, SEC_{1,2,3}, SED e SEE em fluidos sobrenadantes de culturas de *Staphylococcus* spp. e extratos de alimentos. A análise é executada no sistema

VIDAS[®] que alia a moderna automatização de diferentes testes unitários realizados simultaneamente utilizando a metodologia ELFA. Este teste imunológico é similar ao ELISA, apresentando como diferença o substrato 4 MUP (4 Metil umbeliferil fosfato) que, após ser hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, transforma-se em umbeliferona, com emissão de fluorescência a 450nm. A intensidade de fluorescência liberada é medida, e determina o resultado. A maior especificidade do teste ELFA é dada em função do tipo de reação que ocorre no ensaio (sanduíche indireto, sanduíche direto, competição e imunocaptura).

2.7. Surtos de intoxicação estafilocócica associados ao consumo de produtos lácteos

Entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicações causadas por *S. aureus*, destacam-se o leite cru, o leite pasteurizado e os queijos como os produtos lácteos mais incriminados. A contaminação do leite e derivados com *S. aureus* pode ocorrer devido a excreções provenientes da mastite clínica e subclínica (SCHERRER et al., 2004) ou por práticas higiênicas inadequadas durante o processamento e manuseio do alimento. Estes micro-organismos são facilmente inativados com tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas enterotoxinas termoestáveis permanecem ativas nos alimentos, o que representa um risco potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública. Métodos preventivos são as melhores opções para o controle de *S. aureus* em leite e seus derivados, já que, depois de contaminado, a redução do número desses micro-organismos não garante a inocuidade do produto.

Surtos de intoxicações associados a leite e derivados têm sido relatados tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (DE BUYSER et al., 2001). De acordo com a análise dos dados publicados pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (2013), nos Estados Unidos, as enfermidades causadas por patógenos presentes nos alimentos acometem aproximadamente 48 milhões de indivíduos, resultando em 128 mil hospitalizações e 3000 mortes a cada ano. Na América Latina, entre os anos de 1993 e 2002, foram 251 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo

produtos lácteos comprometendo a saúde de mais de 4.200 pessoas (INPPAZ/OPS/OMS, 2013).

No Brasil, embora o número de notificações seja crescente, ele ainda é subestimado. Em um levantamento de surtos e casos de intoxicação alimentar no Estado de Minas Gerais, entre 2006 e 2008, foram notificados 139 surtos ocorridos em 73 municípios, destes, 64 (46,0%) confirmados como intoxicação estafilocócica. A frequência média de ocorrência nesse período foi de 27 notificações a cada semestre. Do total de surtos caracterizados como intoxicação estafilocócica foi detectada a presença de linhagens enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positiva ($>10^5$ UFC.g⁻¹) e de enterotoxinas nas sobras dos alimentos consumidos. As linhagens produtoras de SEA foram as isoladas com maior frequência, seguida da SEC e SEB (DIAS et al., 2008). De acordo com a literatura, a SEA está entre as enterotoxinas identificadas com maior frequência em surtos de intoxicação alimentar.

Carmo et al. (2002) relataram surtos de intoxicação após ingestão de queijo e leite in natura no Estado de Minas Gerais envolvendo 328 pessoas e tendo como agentes etiológicos envolvidos *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em outro estudo, Carmo et al. (2004) registraram a ocorrência, em um único surto, de 16 óbitos de crianças e idosos resultantes da ingestão de alimentos contendo elevada dose de SEA. Segundo os autores, os indivíduos que consumiram em torno de 500 gramas de alimentos teriam ingerido aproximadamente 3 mg de enterotoxina.

Veras et al. (2003) relataram vários surtos de intoxicação alimentar após a ingestão de queijos produzidos no Estado de Minas Gerais, associados principalmente com *S. aureus*. No entanto, não existem relatos de problemas dessa natureza em queijos produzidos com a tecnologia estabelecida para a produção dos queijos artesanais com uso de fermento endógeno.

2.8. *Staphylococcus aureus* em QMA

Pesquisas com QMA que acompanharam o processo de maturação (MARTINS, 2007; DORES, 2013) demonstraram que *S. aureus* foi à espécie que definiu o tempo de maturação, uma vez que permaneceu por um período maior em contagens acima daquelas permitidas pela legislação. As contagens de *S. aureus*, constata por esses autores, variaram de 3,50 log UFC.g⁻¹ nos

QMA da Canastra com oito dias de maturação para contagens de $< 1,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ com 64 dias de maturação, quando mantidos à temperatura ambiente (DORES, 2013). Já nos QMA do Serro essa variação foi de $4,02 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ para $<1,0 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ para os mesmos períodos e temperatura de maturação (MARTINS, 2006). Nos QMA mantidos sob refrigeração atingiram os padrões de segurança microbiológica apenas após os 60 dias determinados pela legislação. Sob refrigeração, as reações enzimáticas microbianas são mínimas, o que impede a inibição dos micro-organismos potencialmente patogênicos e deterioradores. Portanto, ressalta-se aqui a importância de respeitar o processamento tradicional praticado nesses queijos, que consiste na maturação à temperatura ambiente.

Embora o QMA apresente condições para produção de enterotoxinas, não só pelas características intrínsecas, mas também pelas altas contagens de *S. aureus* muitas vezes as enterotoxinas não são detectadas (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2007; DORES, 2013).

Considerando-se que a presença de *S. aureus* é comum em QMA e a inexistência de relatos de surtos de intoxicação estafilocócica ao seu consumo, estudos devem ser realizados a fim de elucidar o comportamento dessas bactérias e a produção de suas toxinas, além de determinar qual o papel da microbiota endógena na inibição da síntese de enterotoxina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

As amostras de queijo Minas artesanal e do fermento endógeno foram coletadas diretamente nas unidades produtoras em dois períodos do ano, período das águas no mês de maio e período da seca no mês setembro. Foram selecionadas oito propriedades rurais na região de Medeiros (MG), de acordo com uma listagem fornecidas pelo IMA e EMATER, que incluíam unidades produtoras com diferentes graus de adequação de modo a contemplar queijos com diferentes graus de contaminação. Foram coletadas oito amostras de queijo com oito dias de maturação e oito amostras do fermento endógeno em cada um dos períodos, perfazendo um total de 32 amostras. As amostras foram mantidas e transportadas refrigeradas em caixas isotérmicas a 10 °C até o momento das análises.

As análises das amostras de queijos e do fermento endógeno foram encaminhadas ao laboratório de culturas lácticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após as análises microbiológicas, as mesmas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de enterotoxina da Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte, para análise de enterotoxinas estafilocócicas. Após o isolamento as estirpes de *S. aureus*, foram encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa gado de leite, em Juiz de Fora, para amplificação dos genes de enterotoxinas.

3.2. Avaliação das características físico-químicas do fermento endógeno e do QMA

A determinação do pH das amostras de fermento endógeno e do QMA foi feita em medidor de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2, introduzindo-se eletrodo específico para queijos na parte interna. Já as análises umidade, cloretos e acidez titulável foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Pereira, et al. (2001).

3.3. Contagem e isolamentos de *Staphylococcus aureus*

O preparo e as diluições das amostras de queijos e do fermento endógeno foram feitas de acordo com a metodologia descrita pelo “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (LANCETTE et al., 2001). Para o preparo do homogenato, 25g de queijo e 25mL de fermento endógeno de todas as amostras foram diluídas em 225mL de água peptonada esterelizada a 2%. Em seguida, as amostras de queijo foram homogeneizadas em um *Stomacher* (Modelo 400; Seward, London, UK), por 1 minuto. Foram feitas diluições decimais para amostras de queijos e do fermento e em seguida foram feitos plaqueamentos, em duplicata, para cada diluição. Os plaqueamentos, as contagens e os isolamentos das estirpes de *S. aureus* foram realizados por meio das placas Petrifilm™ – *Rapid S. aureus Count Plate* (3M Center, St. Paul, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As estirpes foram isolados a partir das placas Petrifilm™ – *Rapid S. aureus Count Plate* (3M Center, St. Paul, USA) um número de colônias igual ao da raiz quadrada da contagem, segundo recomendação do *Bacteriological Analytical Manual for Foods* (FDA, 1972).

3.4. Caracterização do perfil bioquímicos

Após o isolamento, as estirpes de *S. aureus* foram submetidos a provas bioquímicas por meio do sistema de identificação de estafilococos e micrococcos API® *Staph* (BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France). As estirpes de

S. aureus que apresentaram perfil de reações diferentes foram selecionadas e submetidas as análises seguintes.

3.4. Detecção de enterotoxina estafilocócicas no QMA

3.4.1. Teste Qualitativo Imunoenzimático ELFA-VIDAS[®]

Os extratos das amostras de QMA foram preparados de acordo com o protocolo de extrações de amostras de produtos lácteos do método método imunoenzimático *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), realizado em um sistema automatizado VIDAS[®] *Staph enterotoxin II* (BioMérieux). As enterotoxinas testadas foram as: SEA, SEB, SEC, SEC_{1,2,3}, SED e SEE.

3.4.2. Método de Sensibilidade Ótima

Os extratos das amostras de QMA foram preparados de acordo com metodologia descrita por Robbins et al., 1974. A técnica OSP, foi realizada aplicando-se as enterotoxinas e anticorpos padrões SEA, SEB, SEC e SEE em placas de petri 50 x 12mm individuais contendo três mililitros de ágar Nobre fundido. Após solidificado, o ágar foi perfurado de forma a constituir sete orifícios, utilizando-se molde próprio (Figura 3), confeccionado pelo *Food Research Institute* (Madison, Wisconsin, EUA). O anticorpo específico na diluição (1:16) foi colocado no orifício central. A solução de enterotoxina padrão foi colocada nos dois orifícios menores em alíquota de 4µg e a amostra teste foi adicionada nos quatro orifícios mais externos. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas em câmara úmida. Reações positivas foram observadas pela formação de linhas de precipitina formadas entre as amostras e o anticorpo correspondente.

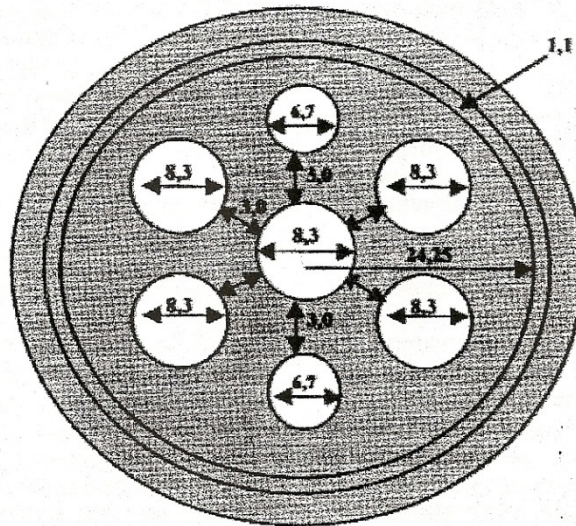


Figura 3 – Molde segundo *Food Research Institute* usado para perfuração dos poços em ágar nobre (medida em mm)

3.5. Indução da produção de enterotoxina estafilocócica pelas estirpes de *S. aureus*

As análises de detecção de enterotoxina pelas estirpes de *S. aureus* foram realizadas no Laboratório de enterotoxinas estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias. As enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED foram testadas de acordo com metodologia descrita por Robbins et al. (1974).

As estirpes de *S. aureus* previamente isoladas e caracterizadas foram inoculadas em 2mL de caldo BHI - Oxoid® e incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas. Para proceder a extração das toxinas, foi empregado o método da membrana sobre ágar utilizando-se de placas de Petri de 100mm com 20mL de ágar BHI - Oxoid®, recobertas com disco de membrana de diálise Spectra/Por® [Spectrum Labs., EUA]. Um inóculo de 0,5mL da cultura em caldo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre a superfície da membrana e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Os cultivos assim obtidos foram lavados com 2,5mL de Na₂HPO₄ 20 %m/m e pH 7,4, em duas etapas. Na primeira foi utilizada 1,5mL e na segunda, logo após a primeira, 1,0mL do tampão fosfato. Os lavados das culturas foram centrifugados a 10.000 x g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados para verificação da produção de enterotoxinas. Os sobrenadantes foram submetidos ao método OSP, já descrito anteriormente item 3.4.2.

3.6. Determinação da presença dos genes das enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE SEG) nos isolado de *S. aureus*

3.6.1. Extração do DNA

As estirpes de *S. aureus* foram analisadas quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sed* e *see*. O DNA celular foi extraído, conforme descrito por Hesselbarth e Schwarz (1995). Para extração do DNA foi utilizada uma colônia de cada isolado, crescida em ágar infusão de cérebro e coração (Difco) a 35 °C por 24 horas e repicada em caldo infusão de cérebro e coração (Difco). Após incubação sob agitação (250 xg) a 37 °C por 14-18 horas, 1,6mL da cultura foi transferida para tubo *Eppendorf* e centrifugada a 12.000xg por 5 minutos. os sedimentos foram ressuspensos com 1mL tampão TES (1X) [N-tris(hidroximetil) ácido metil 1-2-aminoetenolsulfônico] e centrifugados novamente sob as mesmsa condições. O sedimento foi novamente ressuspensos com 500µL tampão TES (1X) e agitadas em agitadores tipo vortex. Em seguida, foram adicionados 5µL de lisostafina (1mg/mL) e 10µL de lisostafina bruta e, após agitação e incubação a 37°C por 30 minutos, foram adicionados 20µL de Dodecil Sulfato de Sódio a 10%. O tubo *Eppendorf* foi invertido, lentamente, por várias vezes, e deixado em repouso por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 250µL de fenol e 250µL de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após agitação e centrifugação a 12.000 xg por 5 minutos (duas vezes), o DNA foi precipitado com isopropanal (100%), centrifugado a 12.000 xg por 30 minutos, e o sobrenadante descartado (HESELBARTH; SCHWARZ, 1995). O *pellet* de DNA foi seco em estufa a 30°C e ressuspensado em 40µL de água Milli-Q. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biociences) e a concentração ajustada para a PCR.

3.6.2. Amplificação por PCR utilizado os iniciadores específicos para a detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *seg*.

A detecção dos genes codificadores de enterotoxinas foi realizada utilizando-se um protocolo de PCR simples para o gene *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, e

see. Os oligonucleotídeos foram descritos por Rosec e Gigaud (2002), listados na Tabela 1. As reações foram realizadas sob condições descritas por Rosec e Gigaud (2002), com algumas modificações propostas por Arcuri et al. (2004).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas técnicas PCR para detecção de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

Oligonucleotídeos (5'– 3')	Gene Alvo	Enterotoxina Codificada	Produto amplificado
SEA1: ACG ATC AAT TTT TAC AGC SEA2: TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC	<i>sea</i>	SEA	544 pb
SEB1: GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC SEB2: TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C	<i>seb</i>	SEB	416 pb
SEC1: GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT SEC2: AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA	<i>sec</i>	SEC	257 pb
SED1: TTA CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT SED2: CCA CCA TAA CAA TTA ATG C	<i>sed</i>	SED	334 pb
SEE1: ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA SEE2: TAA CTT ACC GTG GAC CC	<i>see</i>	SEE	170 pb
SEG1: ACGTCTCCACCTGTTGAAGG SEG2: TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	<i>seg</i>	SEG	400 pb

Fonte: Rosec e Gigaud (2002).

A amplificação dos genes foi realizada em termociclador Thermo Hybaid (Modelo PxE Thermal Cycler - PxE 20102). Dessa forma, utilizou-se uma mistura de 50µL, contendo 1X de tampão PCR, 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 20pmol de cada oligonucleotídeo, 2U da enzima Taq polimerase, 100ng de DNA bacteriano completando-se o volume para 50µL com água Mili-Q esterelizada. As condições de amplificação utilizadas foram um ciclo inicial de desnaturação a 94°C, por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 30s, anelamento a 57°C, por 30s e extensão a 72°C, por 30s e um ciclo final de polimerização a 72°C, por 10min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,5%, m/v) corado com solução de brometo de etídio (0,005%, m/v) e fotografados em foto documentador (Eagle Eye II, Stratagene).

Para cada gene pesquisado foi utilizado um controle positivo da reação. As estirpes *S. aureus* ATCC 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed, seg*), *S. aureus* ATCC 27664 (*see*) foram utilizadas como controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características físico-químicas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra

As características físico-químicas – pH, acidez e NaCl, do fermento endógeno, com exceção do teor de sal, não diferiram ($p < 0,05$) entre as estações do ano, águas e seca. No entanto, houve uma variação dos resultados entre os produtores em uma mesma estação. Esses resultados variaram de 0,45 a 0,71% de ácido láctico no período das águas e 0,47 a 1,03% ácido láctico na seca; pH de 4,66 a 5,40 nas águas e 4,70 a 5,79 na seca. Os teores de NaCl variou de 4,14 a 11,24% nas águas e 1,70 a 8,90% na seca (Tabela 2).

A alta variação da composição final dos fermentos coletados em uma mesma região pode ser associado à falta de padronização no processo de obtenção e no modo de armazenamento nas propriedades rurais. Estas variações ocasionam as diferenças na composição final nos queijos originados destes fermentos. Em trabalhos conduzidos por Pinto (2008) na região do Serro foram observados variações de 5,36 a 10,14 % de NaCl e 4,15 a 5,08 de pH. Na mesma região, os resultados encontrados por Pimentel Filho et al. (2005) variaram de 3,55 a 22,48 % de NaCl e 5,03 a 6,86 de pH.

Os valores baixos de pH constatados, pode ser associado a multiplicação da microbiota presente (NÓBREGA, 2007), assim como a temperatura de armazenamento do fermento. De acordo com Pinto (2008), quanto maior o tempo em que o fermento permanece a temperatura ambiente, maior será o crescimento microbiano e, conseqüentemente, menor o pH.

Em relação ao sal, embora não ter havido diferença entre as estações do ano, é prática comum dos produtores de QMA adicionar uma concentração de sal maior no período das águas. Esse procedimento empírico é realizado considerando o grau de contaminação dos queijos nesse período.

Tabela 2 – Valores médios de acidez, pH e concentração de NaCl do fermento endógeno originado na região da Serra da Canastra e coletado em dois períodos do ano (águas e seca).

Período	Produtor	Acidez (%)	pH	NaCl (%)
Águas	1	0,65	5,10	6,50
	2	0,50	4,66	7,69
	3	0,69	4,66	4,14
	4	0,71	5,07	8,87
	5	0,45	5,38	11,24
	6	0,45	5,40	7,69
	7	0,60	4,81	5,32
	8	0,50	5,10	7,69
	Médias	0,56a	5,02a	7,39a
Seca	1	0,63	5,06	5,40
	2	0,47	5,39	6,13
	3	1,03	5,04	2,00
	4	0,61	5,28	8,90
	5	0,80	5,15	2,60
	6	0,60	5,12	4,10
	7	0,59	4,70	1,70
	8	0,57	5,79	2,25
	Médias	0,66a	5,19a	4,52b

Médias para cada parâmetro, seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste F (P<0,05).

Os queijos fabricados com os fermentos não apresentaram diferenças significativas nas características físico-químicas entre as estações do ano (águas e seca) (Tabela 3). Constatou-se a ocorrência de variações das características físico-químicas entre os produtores de uma mesma estação do ano. Essas variações foram de: 40,41 a 48,82% de umidade no período das águas e 40,76 a 48,83% de umidade na seca; pH de 4,82 a 5,33 nas águas e 4,81 a 5,40 na seca, já o teor de NaCl apresentou variação de 1,24 a 1,71% nas águas e 1,15 a 1,75% na seca. Esse resultado demonstrou a possibilidade da ocorrência de queijos de uma mesma região com características físico-

químicas diferentes. Resultados semelhantes foram observados por Borelli (2006), Martins (2007) e Pinto (2008).

Tabela 3 – Umidade, pH e NaCl do queijo Minas artesanal da Canastra com oito dias de maturação

Período	Produtor	Umidade	pH	NaCl
Águas	01	41,92	4,89	1,71
	02	43,54	4,99	1,49
	03	48,82	5,01	1,61
	04	40,41	5,08	1,24
	05	49,71	5,07	1,25
	06	45,19	5,02	1,30
	07	49,69	5,33	1,24
	08	44,04	4,82	1,62
	Média	45,42a	5,03a	1,43a
Seca	01	40,76	4,87	1,55
	02	44,96	4,81	1,35
	03	42,97	4,90	1,70
	04	48,28	4,95	1,75
	05	48,83	4,96	1,25
	06	43,60	5,12	1,60
	07	43,30	5,40	1,65
	08	45,64	4,98	1,15
	Média	44,79a	5,00a	1,50a

4.2. Enumeração de *S. aureus* em fermento endógeno e em queijo Minas artesanal da Canastra

As variações observadas nas contagens de *S. aureus* no fermento endógeno foi de <1 a 3,11 log UFC.mL⁻¹ no período das águas e de <1 a 2,76 log UFC.mL⁻¹ do período da seca. Os valores médios entre as estações do ano não apresentaram diferença significativa (p<0,05). Embora não existam padrões microbiológicos para o fermento endógeno, os valores de *S. aureus* são considerados altos, comparado com a legislação para queijos artesanais que exige 2 log UFC.g⁻¹. Assim, aproximadamente 50% das amostras de fermento endógeno apresentaram contagens superiores à permitida para comercialização de queijos.

Tabela 4 – Contagem de *S. aureus* em amostras de fermento endógeno e no queijo Minas Artesanal da Canastra coletados nos períodos das águas e da seca.

Período	Produtor	Contagens de <i>S. aureus</i>	
		Fermento endógeno (log UFC.mL ⁻¹)	Queijo (log UFC.g ⁻¹)
Águas	01	1,77	5,18
	02	2,14	5,26
	03	<1,00	3,48
	04	1,69	3,56
	05	2,07	3,70
	06	1,00	5,88
	07	2,83	3,48
	08	3,11	3,78
	Média	1,95a	4,29a
Seca	01	1,60	3,18
	02	2,23	3,11
	03	<1,00	3,30
	04	2,15	4,60
	05	1,85	3,15
	06	2,76	3,45
	07	1,00	3,53
	08	1,00	3,72
	Média	1,70a	3,50a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

O alto teor de sal não influenciou a multiplicação de *S. aureus* em nenhuma das amostras de fermento. *Staphylococcus* são bactérias halofílicas, o que explica a sua multiplicação no fermento. Espécies desse gênero podem crescer na ausência de sal, mas podem multiplicar-se também em ambientes com concentrações de 7 a 10%. Algumas estirpes podem crescer em meios com até 20% de sal (JAY, 2005). Além disso, ressalta-se que as células de *S. aureus* oriundas do fermento podem apresentar maior resistência às condições adversas, como baixo pH e altas concentrações de sal, uma vez que sobreviveu por quase 12 horas durante a fermentação (PINTO, 2008).

Pimentel Filho et al. (2005), ao analisarem amostras de fermento endógeno coletados na região do Cerrado, constataram que mesmo em altas concentrações de sal, a população de *S. aureus* no fermento atingia até 3 log

UFC.mL⁻¹. Segundo Borelli (2006), 70% dos fermentos naturais utilizados na fabricação dos queijos da Serra da Canastra estavam contaminados com *S. aureus*, com contagens entre 4,8 a 6,3 log UFC.mL⁻¹. Lima (2005) também constatou altas contagens de *S. aureus* no fermento endógeno coletado na região da Serra do Salitre.

O uso do fermento endógeno é essencial para produção de QMA. Assim, cuidados de Boas Práticas de Fabricação e o uso da refrigeração são práticas essenciais para obtenção de QMA de boa qualidade.

As contagens de *S. aureus* nas amostras de queijo apresentaram-se entre 3,48 a 5,88 log UFC.g⁻¹, com valor médio de 4,29 log UFC.g⁻¹ para o período chuvoso e de 3,11 a 4,60 log UFC.g⁻¹, valor médio de 3,50 log UFC.g⁻¹ para o período da seca. Em ambos os períodos e em todas as amostras constatou contagens superiores a 2,0 log UFC.g⁻¹, o que não é permitido pela legislação vigente (Tabela 4).

Os fermentos endógenos com maiores contaminações com *S. aureus*, representados pelos produtores 7 e 8 no período das águas e 2 e 6 no período da seca não originaram queijos com maiores contagens deste micro-organismo (Tabela 3). No entanto, o produtor 6, no período das águas e os produtores 7 e 8 na seca, cujos fermentos continham baixa concentração de *S. aureus*, mostraram altas concentrações da bactéria nos queijos. Este resultado reforçou a evidência de que o fermento natural não é o único fator que pode garantir o processo de fabricação de queijo com baixa contaminação deste patógeno. As condições higiênicas dos manipuladores e a qualidade microbiológica do leite e da água também devem ser controladas para prevenir contaminações no produto final (PINTO, 2008).

As variações encontradas nas características físico-químicas do QMA, assim como no fermento endógeno, não impediram o crescimento de *S. aureus* nas amostras e queijos. A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (CARMO, 2002; LOIR et al., 2003).

Em geral, os estudos sobre contagens de *S. aureus* em QMA têm relatado índices de contaminação superiores aos limites estabelecidos pela legislação, que, na maioria das vezes, são associadas às condições higiênico-sanitárias na produção, conservação, transporte e alto índice de mastite

(PINTO, 2004; ARAÚJO et al., 2005; BORELLI; MARTINS, 2006; BORELLI, 2011; DORES, 2013).

Borelli et al. (2006), em Minas Gerais, verificaram que 70% dos queijos tipo Canastra estavam contaminados com *S. aureus*, sendo que em todas as amostras de queijos foi possível detectar *Staphylococcus* sp.. Borges et al. (2008) analisaram *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos de coalho de uma linha de produção, as contagens médias oscilaram de $1,9 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, valor este superior aos limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2001). Sena (2000) analisou 90 amostras de queijo de coalho comercializado em Recife e isolou 377 estirpes de *Staphylococcus*, destas 57,8% foram identificadas como *S. aureus*.

Pinto et al. (2004) analisaram 30 amostras de queijo artesanal do Serro constataram contagens de *S. aureus* entre 4,5 a 7,2 log UFC.g⁻¹. Muitos pesquisadores ao avaliarem QMA observaram resultados semelhantes (CERQUEIRA et al., 1997; BORELLI, 2002; FARIA, 2003; ARAÚJO, 2004; ORNELAS, 2005; MARTINS, 2006; BORELLI, 2006). No entanto, é possível encontrar na literatura internacional também pesquisas com queijos artesanais de vários países europeus com qualidade microbiológicas semelhantes aos produzidos no Brasil (MACEDO et al., 1996; ZÁRATE et al., 1997; ESTEPAR et al., 1999; PSONI et al., 2003; JAKOBSEN et al., 2011).

Na Alemanha, Akneiden et al. (2008) estudaram queijos feitos a partir de leite cru e obtiveram contagens de 3×10^1 a $8,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹. Na Itália, Poli et al. (2007) analisaram queijos locais, tipo Monte Veronese, e constataram que 78% (36/46) das amostras apresentavam contagens acima do limite local.

Queijos produzidos com leite pasteurizado também foram avaliados quanto à presença de *Staphylococcus* e apresentaram qualidades microbiológicas semelhantes aos artesanais. Assim outras fontes de contaminação devem ser avaliadas e não apenas o leite cru. Salotti et al. (2006) analisaram queijos Minas frescal e observaram contagens $<1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ sendo que 15% (9/60) das amostras apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Carvalho et al. (2007) avaliaram o mesmo produto e observaram que 7,5% (4/31) das amostras apresentavam contagens excessivas.

Andre et al. (2008) e Komatsu et al. (2010) obtiveram resultados mais expressivos, com 54,2% (13/24) e 88% (44/50) do total de amostras de queijos

Minas frescal com contagens acima dos limites permitidos, respectivamente. Esper (2006) realizou contagens de *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativas (SCN) em ricotas e relatou números que variaram de 10^2 a 10^6 UFC.g⁻¹, porém, apenas 2,2% (1/45) das amostras estavam acima dos limites estabelecidos para o alimento (5×10^2 UFC.g⁻¹) (BRASIL, 2001). Já Pelisser et al. (2009) detectaram que 63,3% (19/30) dos queijos americanos e coloniais apresentavam SCP, sendo que em 28,8% (5/19) dos produtos as contagens foram maiores que 10^3 UFC.g⁻¹, limite máximo estipulado pela legislação (BRASIL, 2001).

4.3. Detecção de enterotoxina nas amostras de queijo Minas artesanal da Canastra

Apenas a SEA foi detectada nos queijos pelo método OSP. Dentre as oito amostras analisadas no período das águas e dentre as oito analisadas no período da seca, 75% apresentaram a SEA, sem a influência do período na produção de enterotoxina (Tabela 5). Os resultados das contagens de *S. aureus* não tiveram relação com a produção de enterotoxina, uma vez que queijos com contagens menores de *S. aureus* apresentaram resultados positivos para SEA. Assim, a ocorrência de SE em queijos artesanais pode estar associado à capacidade das estirpes em produzir enterotoxina do que com a concentração do micro-organismo no alimento. No entanto, é importante ressaltar que é possível a produção de SE por outras espécies de *Staphylococcus* spp. não avaliadas neste trabalho.

Tabela 5 – Enterotoxinas detectadas pelos métodos *Optimum Sensitive Plate* (OSP) e ELFA-VIDAS® *Staph Enterotoxin II* (Bio Merieux) em amostras de fermento endógeno e no queijo Minas Artesanal da Canastra coletados nos períodos das águas e da seca.

Período	Produtor	Enterotoxinas nos queijos		
		OSP		VIDAS®
		SEA	SEB, SEC, SED	SEA, SEB, SEC, SEC _{1,2,3} , SED, SEE
Águas	01	-	-	-
	02	+	-	-
	03	+	-	-
	04	+	-	-
	05	-	-	-
	06	+	-	-
	07	+	-	-
	08	+	-	-
Seca	01	+	-	-
	02	+	-	-
	03	+	-	-
	04	+	-	-
	05	-	-	-
	06	-	-	-
	07	+	-	-
	08	+	-	-

+ detectado; - não detectado

Todavia, pelo método ELFA-VIDAS, não foram detectadas enterotoxinas em nenhuma das amostras (Tabela 4). As amostras apresentaram resultados com um valor teste inferiores ao limite, o que indica que as amostras não contêm enterotoxinas ou que contêm uma concentração inferior ao limite de detecção do método, embora as contagens de *S. aureus* permitirem produção de enterotoxinas.

Araújo (2004) e Pinto (2004), em QMA de Araxá e do Serro, respectivamente, relataram altas contagens de *S. aureus* suficientes para produzir a toxina, mas esta não foi detectada, por meio do método ELFA-VIDAS, em nenhuma das amostras. Borelli et al. (2011) encontraram resultados semelhantes com QMA da Canastra. Lima (2005), ao analisar 43 amostras de queijos de coalho artesanal e industrial, não detectou SE em nenhuma das amostras.

Resultados contrários foram observados por Borges et al. (2008), que ao avaliarem linhas de produção de queijo de coalho, constataram a presença de enterotoxinas em 20% (4/20) das amostras analisadas. Em análise realizada em leite *in natura*, dentre as 43 estirpes de *Staphylococcus* submetidas ao teste para detecção de enterotoxina, 33 (77%) foram consideradas positivas, havendo um predomínio de *S. aureus* com identificação presuntiva e confirmatória, em número de 19 estirpes positivas e também do *S. intermedius* com nove estirpes. Rapini et al. (2002) evidenciaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas em contagens de 10^4 UFC.g⁻¹ de *Staphylococcus* sp. em queijos de coalho comercializados no Nordeste do Brasil.

A SEA está entre as enterotoxinas identificadas com maior frequência em surtos de intoxicação alimentar (CARMO et al., 2004). No entanto, não apenas a SEA, nas outras enterotoxinas já foram identificadas em queijos artesanais por meio do método OSP. Borelli et al. (2006), ao analisarem a presença de SE em queijos artesanais da Canastra, constataram a SEB e SEC enquanto que Gómez-Lúcia et al. (1992), ao estudarem a produção de enterotoxina, constataram as enterotoxinas do tipo SEA e SED. Tasci et al. (2011) observaram que apenas 6% das amostras de queijo consumidos na Turquia constataram enterotoxinas, entre elas SEB, SEC e SEE.

Embora o método imunoenzimático ELFA-VIDAS apresente uma sensibilidade superior (< 1ng/mL) à apresentada pelo método OSP (100 ng/mL), a não detecção de enterotoxinas pelo primeiro método contradiz os 75% de amostras de queijos positivas para SEA encontradas pelo método OSP. Dias et al. (2008), ao comparar os métodos de detecção de enterotoxina – OSP e ELFA-VIDAS observaram que em 91 amostras de alimentos, 31,4% apresentaram resultados positivos para enterotoxina, pelo método OSP, porém, todas elas foram negativas quando testadas pelo método ELFA-VIDAS. O resultado inverso ocorreu em 8,0% das amostras, sendo que a concordância para os resultados positivos ocorreu em 18,7%, e negativos para 38,5% das amostras.

Ambos os métodos testados para a pesquisa de enterotoxina no QMA da Canastra apresentam interferentes que podem comprometer o resultado, enquanto resultados falso-positivos para método OSP podem ocorrer associado ao grau de homologia entre outros tipos de SE (não testadas neste trabalho), o que ocasiona reações cruzadas. O método de detecção ELFA-

VIDAS pode associar resultados falso-negativos devido à presença de possíveis interferentes como substâncias não imunológicas ligadas à matriz, como as enzimas endógenas: fosfatase alcalina e lactoperoxidase (DIAS et al., 2008; HENNEKINNE et al., 2012).

É amplamente reconhecida a dificuldade de utilização de métodos imunológicos para detecção de toxinas em matrizes alimentares, devido principalmente à falta de especificidade e sensibilidade do ensaio. Alguns inconvenientes como, a necessidade de toxinas altamente purificadas e a baixa especificidade de alguns kits comerciais, em que falsos-positivos podem ocorrer dependendo componentes alimentares (WIENEKE, 1991; SCHLIEVERT; CASE, 2007).

4.4. Isolamento e caracterização do perfil bioquímico das estirpes de *S. aureus* isoladas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra

Dentre as amostras de queijo Canastra de fermento endógeno foram isoladas 113 estirpes de *S. aureus*, sendo que, destes, 43 estirpes foram isoladas do fermento endógeno e 70 estirpes isoladas das amostras de queijo Canastra, ambas no período das águas e da seca. Assim, dentre as estirpes isoladas, foram selecionadas as estirpes que apresentaram perfis bioquímicos diferentes pelo sistema de identificação API[®] Staph (BioMérieux), obtendo-se um total de 44 estirpes isoladas (G1 a G44).

Como as estirpes foram isoladas a partir de Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA), que utiliza um disco reativo de Nuclease termoestável (TNAse), foi considerado que todas as estirpes são TNAse positivas. No entanto, de acordo com o fabricante, outros micro-organismos, além de *S. aureus*, se presentes, podem produzir TNAse, como *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* e *Staphylococcus intermedius*.

4.5. Capacidade de produção de enterotoxina *in vitro* pelas estirpes de *S. aureus* isoladas do fermento endógeno e do queijo Minas artesanal da Canastra

As estirpes seleccionadas pelo sistema de identificação *API*[®] *Staph* (BioMérieux) foram induzidas para produzir enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, por meio do método OSP. Os resultados da detecção de enterotoxina pelas estirpes de *S. aureus* seleccionadas estão na Tabela 5.

Tabela 6 – Detecção de enterotoxina em estirpes de *S. aureus* isoladas de fermento endógeno e de queijo artesanal da Canastra.

Estirpes	Enterotoxinas	Estirpes	Enterotoxinas
G1	Negativo	G23	Negativo
G2	Negativo	G24	Negativo
G3	Negativo	G25	Negativo
G4	Negativo	G26	Negativo
G5	Negativo	G27	Negativo
G6	Negativo	G28	Negativo
G7	Negativo	G29	Negativo
G8	Negativo	G30	Negativo
G9	Negativo	G31	Negativo
G10	Negativo	G32	Negativo
G11	SEA	G33	Negativo
G12	Negativo	G34	Negativo
G13	Negativo	G35	Negativo
G14	Negativo	G36	Negativo
G15	Negativo	G37	SEC
G16	Negativo	G38	Negativo
G17	SEA	G39	Negativo
G18	Negativo	G40	Negativo
G19	Negativo	G41	Negativo
G20	Negativo	G42	Negativo
G21	Negativo	G43	Negativo
G22	Negativo	G44	Negativo

A capacidade de produzir enterotoxina foi constatada em 12,5% das estirpes analisadas. Dentre as enterotoxinas constatadas, a SEA prevaleceu seguida pela a SEC detectada em menor concentração. A presença da SEA foi

constatada em 4,55% (2/44) das amostras e a SEC em 2,28% (1/44) (Tabela 6).

A produção de enterotoxina pelas estirpes de *S. aureus* isoladas não apresentaram variação, sendo detectadas isoladamente. As estirpes isoladas das amostras de queijo artesanal e do fermento endógeno apresentaram baixa toxigenicidade para as enterotoxinas testadas, uma vez que poucas estirpes foram capazes de produzir as enterotoxinas *in vitro*.

Cenci-Goca et al. (2003) avaliaram o potencial enterotoxigênico de 160 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite proveniente de vacas com mastite. Constataram que apenas 13,5 % (22/160) das estirpes eram produtoras de enterotoxinas e dentre essas, sete produziram SEC, doze SED e três SEC e SED.

Na França, Rosec e Gigaud (2002) isolaram 213 estirpes de *S. aureus* em 121 produtos alimentícios, incluindo leite e queijos. Esses autores constataram que 30,5% (65/213) das estirpes produziam pelo menos uma ou duas das cinco enterotoxinas clássicas.

Em Recife, Sena et al. (1997) detectaram várias enterotoxinas nos *pools* de estirpes isolados de queijos de coalho testados, pelo método OSP. Foram identificados os seguintes resultados: dos 78 *pools* de *S. aureus*, 48 (61,5%) produziram enterotoxina B; 10 (12,9%), toxina C e 2 (2,5%), produziram SED. Não foi detectada a SEA.

Lamaita et al. (2005), ao analisarem leite cru refrigerado pelo método OSP, identificaram a produção de SEA, SEB, SEC, e SED em percentuais variados. Dentre 138 *pools* de *Staphylococcus* testados, 91 produziram, pelo menos, uma toxina isoladamente ou em associação a outras toxinas.

Dentre 112 estirpes de *S. aureus* isolados de leite cru e produtos derivados, Morandi et al. (2007) detectaram apenas 58 estirpes capazes de produzir enterotoxina. Stamford (2006) verificou que 50% das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de leite *in natura* eram capazes de produzir enterotoxina.

Ao comparar os resultados de detecção de enterotoxina nas amostras de queijos e os resultados de indução *in vitro* das estirpes de *S. aureus*, verificou-se que a presença da SEA em 75% das amostras de QMA da Canastra (Tabela 5) comprova a produção destas pelas estirpes G17 e G11 isoladas. No entanto, a produção de enterotoxina nos queijos pode ocorrer por

outras espécies de *Staphylococcus* presentes no queijo e não isoladas neste estudo. A produção de enterotoxinas por estirpes de *Staphylococcus* não produtores de TNase é relatada em alguns estudos (VERNOZY-ROZAND et al., 1996a; PEREIRA; CARMO; PEREIRA, 2001). Assim, fazem-se necessários mais estudos para relacionar o comportamento de outras espécies de *Staphylococcus* e a produção de enterotoxina em QMA.

A não detecção da SEC no queijo produzida pela estirpe G37 pode ser explicada pela menor sensibilidade do método OSP em relação aos outros métodos imunológicos, baixa produção da toxina apresentada pela estirpe ou, ainda, que as condições de crescimento da bactéria não eram ideais para que houvesse expressão gênica. Certas condições são necessárias para a produção de enterotoxinas em alimentos, como a presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, presença de substrato para o crescimento microbiano, bem como temperatura e tempo adequados para a produção da toxina (BERGDOLL, 1989; JAY, 2005). Essas condições não foram observadas durante a elaboração do queijo Minas produzido na região da Serra da Canastra.

4.6. Identificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *seg* das estirpes de *S. aureus* isoladas

Ao avaliar a presença dos genes que codificam a produção das enterotoxinas clássicas, dentre as 44 estirpes de *S. aureus* analisadas, apenas o isolado G39 foi positivo para o gene *seb* (Tabela 5 e Figura 4). Embora a SEG não ser uma enterotoxina clássica, esta também foi testada e o isolado G33 foi positivo para o gene que a codifica (Tabela 7 e Figura 5). Os genes *sea*, *sec*, *sed* e *see* não foram detectados nas estirpes pesquisadas, houve apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado para os respectivos genes nas estirpes de referência usadas como controle positivo (Anexo 1).

Por este fato, pode-se concluir que os isolados apresentaram baixo potencial enterotoxigênico com relação às enterotoxinas clássicas e que não houve expressão gênica, uma vez que não detectou-se genes codificadores.

Tabela 7 – Detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *seg* de enterotoxinas estafilocócicas em 44 estirpes de *S. aureus* isoladas do fermento endógeno e do queijo artesanal da Canastra.

Estirpes	Genes	Estirpes	Genes
G1	Negativo	G23	Negativo
G2	Negativo	G24	Negativo
G3	Negativo	G25	Negativo
G4	Negativo	G26	Negativo
G5	Negativo	G27	Negativo
G6	Negativo	G28	Negativo
G7	Negativo	G29	Negativo
G8	Negativo	G30	Negativo
G9	Negativo	G31	Negativo
G10	Negativo	G32	Negativo
G11	Negativo	G33	<i>seg</i>
G12	Negativo	G34	Negativo
G13	Negativo	G35	Negativo
G14	Negativo	G36	Negativo
G15	Negativo	G37	Negativo
G16	Negativo	G38	Negativo
G17	Negativo	G39	<i>seb</i>
G18	Negativo	G40	Negativo
G19	Negativo	G41	Negativo
G20	Negativo	G42	Negativo
G21	Negativo	G43	Negativo
G22	Negativo	G44	Negativo

negativo para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *seg*

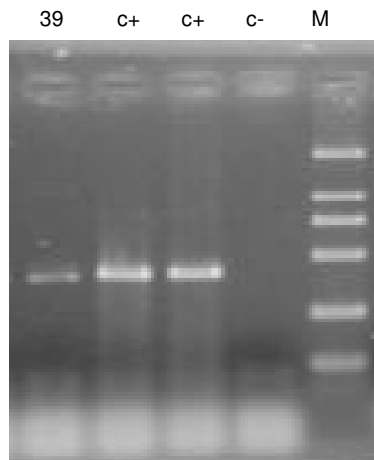


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os *primers* SEB1/ SEB2 para o gene *seb* específico da enterotoxina estafilocócica SEB. Coluna 39: isolado positivo para o gene *seb*. Coluna C+: controle positivo gene *seb* (*S. aureus* ATCC 14458). Coluna c-: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

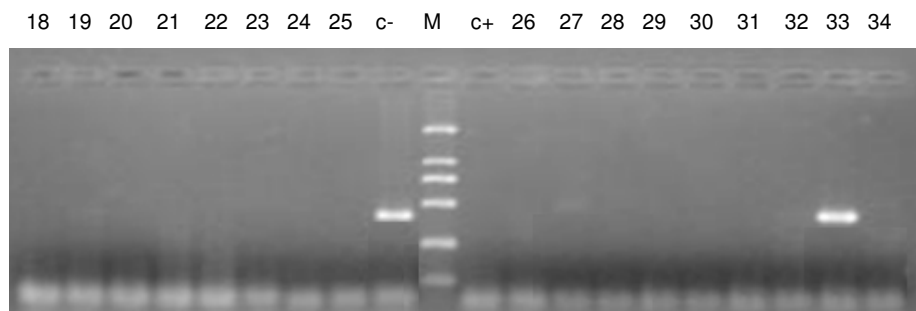


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* SEG1 e SEG2 para o gene *seg* específico da enterotoxina estafilocócica SEG. Coluna 18 a 34: isolado negativos para o gene *seg*. Coluna C+: controle positivo gene *seg* (*S. aureus* ATCC 19095); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb)

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Borelli et al. (2011), que ao analisarem estirpes de *Staphylococcus* isoladas do queijos Minas produzidos com leite cru, verificaram que nenhuma das estirpes expressam enterotoxinas SEA, SEB, SEC, e SED.

Gucukoglu et al. (2012) verificaram que 13,7% (7/51) das estirpes de *S. aureus* provenientes de leite cru foram positivas para os genes *sea* e *seb*. Hunt et al. (2012) relataram que 83,2% das estirpes isoladas de leite cru e queijos relacionados não continham os genes de expressão de SE. Silva et al. (2005) também constataram uma menor frequência de estirpes de *Staphylococcus* enterotoxigênicos no leite de vacas com mastite. Entre as 64 estirpes de *S. aureus* isoladas por esses autores, apenas quatro estirpes apresentaram co-amplificação do gene *seb* e dois tiveram o gene *seg*. O mesmo foi observado por Ertas et al. (2010) em que apenas 3,02% dos isolados de *S. aureus* de queijos apresentaram gene para as SEA, SEB e SED.

Vernozy-Rozand et al. (1996) verificaram baixa porcentagem – 5,9% (11/187) – de *Staphylococcus* enterotoxigênicos entre as 187 estirpes de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite, soro e queijo de cabra e, entre os cinco genes e enterotoxinas clássicas pesquisadas, apenas a presença do gene *see* e a produção de SEE foi constatada nos 11 isolados enterotoxigênicos. Rosec e Gigaud (2002) também constataram baixa incidência de genes enterotoxinas (9/74) em estirpes de *Staphylococcus* sp. Em outro estudo, Pereira et al. (2001), ao avaliarem o comportamento de estafilococos, inocularam estas linhagens em leite UHT e presunto cozido e encontraram contagens de estafilococos variando entre 10^5 e 10^9 UFC.mL⁻¹, não sendo possível a detecção da enterotoxina estafilocócica nos alimentos em questão.

Dentre os 12 *pools* de estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados do queijo de coalho artesanal e industrial no estado do Ceará, apenas um *pool* (8,33%) de estirpes foi capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas (LIMA, 2005). Por outro lado, Borges (2008), em 12 (37,5%) das 32 estirpes de *Staphylococcus* isoladas de leite cru, coalhada e queijo, foram positivas para os genes *sea* ou *sec*, entre os sete genes de enterotoxinas. Em queijos fabricados de leite de ovelha produzido na Eslováquia, Holecková et. al. (2002) também constataram a alta taxa (47,4%) de estafilococos enterotoxigênicos com prevalência de SEB em 36,8% (9/19), seguida de SEA (5,3%) e SEA + SEB (5,3%).

Dentre os 112 estirpes de *S. aureus* isolados de leite cru e produtos derivados, Morandi et al. (2007) detectaram que 75 (67%) estirpes foram positivas para um ou mais genes codificadores de enterotoxinas. Entre os genes detectados estão *sea*, *sed*, *seg*, *seh* e *sei*. Carmo et al. (2004)

observaram que isolados *Staphylococcus* associados a surtos de intoxicação alimentar eram portadores de genes para enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEG, SEH, SEI, e SEJ.

A frequência de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* spp., isoladas de alimentos, é muito variável. Na literatura há relatos que variam de 3,6 (ARCURI et al., 2004) a 100% (NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003).

Dentre as 44 estirpes selecionadas apenas uma codifica o gene *seg*. Embora as enterotoxinas não clássicas ainda serem pouco estudadas em queijos artesanais, muitas são as pesquisas sobre estas enterotoxinas em alimentos e muitas são as associações com enfermidades como as enterotoxinas G e I que já foram associadas com enteropatias em UTIs neonatal (NAIK et al., 2008).

Rosec e Gigaud (2002), a partir de *S. aureus* isolados de diversos alimentos na França, detectaram que 30% eram portadoras dos genes para enterotoxinas clássicas e 60% eram portadoras dos demais genes estudados (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*). A grande incidência de novos genes presentes indica a necessidade de estudos mais específicos sobre estes genes novos.

Bloiotta (2000), ao analisarem *Staphylococcus* spp., isolados de leite e carne, encontraram altos índices do gene *seg*. Dentre as 11 estirpes analisadas, dez apresentavam o gene de expressão da SEG. Zocche (2010), ao analisar 41 estirpes de *S. aureus* de produtos de origem animal (carne de frango, leite cru, embutidos cárneos e queijo), detectou que 7,3% das estirpes apresentavam o gene *seg*.

Ao comparar os resultados das análises de indução das estirpes por meio do método OSP e as análises genotípicas por meio da PCR, observou-se a concordância entre eles, pois 95,45% dos isolados testados pelo método OSP e 97,72% dos isolados testados pela análise molecular apresentaram resultados negativos. No entanto, não foi verificado a associação entre os resultados com os testes bioquímicos e aqueles obtidos por PCR, uma vez que as estirpes que apresentaram resultados positivos para produção de enterotoxinas clássicas não poderiam produzi-las, pois não foi possível identificar o gene que codifica tais enterotoxinas.

De acordo com Gilligan (2000), os testes imunológicos são muito usados para a detecção de *S. aureus* e de suas enterotoxinas, contudo, sua sensibilidade e especificidade podem variar de acordo com o grau de pureza dos reagentes e níveis de expressão da toxina.

Poli et al. (2002) relataram ainda que o alto grau de homologia entre as SE pode levar a reação cruzada com anticorpos específicos, quando testes imunológicos são utilizados para o diagnóstico. Esse fato dificulta a identificação das diferentes enterotoxinas, uma vez que cada uma delas deve ser testada separadamente (LANCETTE; BENNETT, 2001). Segundo Aitichou et al. (2004), o limite de sensibilidade, associado a possibilidade de reação cruzada, são as maiores desvantagens dos ensaios imunológicos, fazendo com que seja necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico bacteriano.

A falta de similaridade entre os resultados das análises bioquímicas e moleculares descrita na literatura. Rosec e Gigaud (2002), a partir de *S. aureus* isolados de diversos alimentos na França, observaram discordância em 7,4% dos isolados, pois foram positivos no teste de ELISA e não apresentaram os respectivos genes para enterotoxinas clássicas. Ao analisar leite cru bovino e caprino, Jorgensen et al. (2005) observaram 4% de não similaridade entre os métodos RPLA e PCR em seus estudos com 225 estirpes de *S. aureus*. Os autores detectaram três isolados com o gene *sec*, sem produção da enterotoxina, cinco isolados SEA e SEC positivos sem os respectivos genes e um isolado SEA positivo sem a presença do gene *sea*.

McLauchlin et al. (2000) analisaram 129 isolados de *S. aureus* no que diz respeito à produção de enterotoxinas (SEA-SED) e observaram 4% de não similaridade, sendo que, destes, um isolado produtor de SEB e outro de SED (métodos RPLA e ELISA), porém os respectivos genes não foram detectados pela técnica de PCR.

Pereira et al. (2009) utilizaram o VIDAS[®] *Staph Enterotoxin* como método imunológico e o PCR como método genético para detecção de enterotoxinas estafilocócicas em 148 culturas de *S. aureus* isoladas de diversos alimentos em Portugal. A comparação dos resultados indicou uma correlação de 80%, sendo que entre os 20% restantes houve: enterotoxina expressa, mas sem a detecção do gene (6%); o gene presente, porém não expresso em toxina (4%); e o resultado do método imunológico foi positivo para SEA-SEE, mas o gene detectado foi outro, não sendo codificador de enterotoxinas clássicas (10%).

5 CONCLUSÃO

As estirpes de *S. aureus* encontradas no fermento endógeno e no queijo Minas artesanal da Canastra apresentam baixo potencial enterotoxinogênico para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, consideradas clássicas. Entretanto, as altas contagens de *S. aureus* detectada nas amostras do QMA da Canastra são de grande preocupação, uma vez que há o risco das enterotoxinas não clássicas estarem presentes. Esses resultados reforçam a necessidade de melhores práticas de higiene na obtenção, processamento e comercialização deste tipo de produto lácteo. Além disso, evidencia-se a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de métodos analíticos que não apresentem interferência nos resultados e que incluam, também, as enterotoxinas não clássicas. Portanto, estudos devem ser realizados a fim de identificar métodos que não apresentem interferentes capazes de comprometer os resultados analíticos. Além disso, estudos que esclareçam quais são os fatores na matriz analisada que influenciam o baixo potencial enterotoxinogênico das estirpes de *S. aureus*. Esses fatores podem ser relacionados à intensa atividade metabólica das bactérias lácticas oriundas do leite cru e do fermento endógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITICHO, M.; HENKENS, R.; SULTANA, A. M.; ULRICH, R. G.; IBRAHIM, M.S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes with PCR-EIA and a hand-held electrochemical sensor. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 373-377. 2004.
- AKINEIDEN, O.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 211-216, 2008.
- ALEGRÍA, A.; ALVAREZ-MARTÍN, P.; SACRISTÁN, N. et al. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 44-51, 2009.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, v. 19, p. 200-207, 2008.
- ARAÚJO, R. A. B. et al. Avaliação de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 14, Goiânia-GO, 2005. **Anais...** Goiânia, 2005.
- ARAÚJO, R. A. B. M. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá. Viçosa: UFV. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ARCURI, E. F.; OLIVEIRA, R. C.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. Avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru refrigerado pela detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, e *sed* através da PCR. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade Federal de Passo Fundo, 2004.
- ARIZCUN, C.; BARCINA, Y., TORRE, P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheeses. **Le Lait**, v. 77, p. 729-736, 1997.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.
- BALLESTEROS, C., POVEDA, J. M., GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A. et al. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchengo cheeses. **Food Control**, v. 17, p. 249-255, 2006.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

- BERGDOLL, M. S. Analytical Methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 91-100, 1990.
- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc., cap.11, p. 464-513, 1989.
- BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M. et al. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1001-1011, 2011.
- BLAIOTTA, G.; PENNACCHIA, C.; VILLANI, F.; RICCIARDI, A.; TOFALO, R.; PARENTE, E. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.
- BORELLI, B. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. And other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brazil, v. 37, p. 545-550. 2006.
- BORELLI, B. M. Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo-de-Minas curado produzido na Serra da Canastra, MG. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- BORELLI, B. M.; LACERDA, I. C. A.; BRANDÃO, L. R.; VIANNA, C. R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. S.; HENEINE, L. G. D.; ROSA C. A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYEV, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 57, de 15 de dezembro de 2011. Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 368, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 out. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamento técnico geral para fixação de**

requisitos microbiológicos de queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução no 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao serviço de inspeção federal. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 25 out. 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos.** Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2001. 18p.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiology**, v. 28, p. 183-200, 2004.

CARDOSO, F. H. T. **Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais.** 1999. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

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

CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; SHUPP, J. W.; PEREIRA, R. K. P.; JETT, M. A case study of a massive *Staphylococcal* food poisoning incident. **Foodborne Pathogens and Disease**, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 241-246, Dec. 2004.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262- 267, 2007.

CENCI-GOGA, B. T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P. V.; MORGANTE, R. A.; CULLOR, J. S. Research note enterotoxina production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1693-1696, Sept. 2003.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; MESQUIARI, M.; RODRIGUES, R. Frequência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 52, n. 299, p. 17-20, 1997.

CHARLIER, C. et al. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 30-39, 2009.

- CHESNEY, P. J. Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview. **Rev. Inf. Dis.**, v. 11, p. 51-57, 1989.
- DE BUYSER, M. L.; 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, Issues 1-2, p. 1-17, 20 July, 2001.
- DIAS, R. S.; SOARES, A. C. C.; PINHEIRO, C. S.; FAÚLA, L. L. Detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de linhagens enterotoxigênicas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. **Revista da Fundação Ezequiel Dias**, v. 3, n. 2, jul./ago. 2008.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, M. P. Exotoxins os produtos elaborados por *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 16-34, 2000.
- DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan canastra cheese. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, n. 1, fevereiro, 2013.
- EMATER. Ações Extensionistas para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista da EMATER – MG**, ano XXII, n. 77, p. 16-17, jul. 2003.
- ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1-2, p. 74-77, 2012.
- ESPER, L. M. R. **Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas – SP**. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006.
- ESTATÍSTICAS DO LEITE. 2008. **Juiz de Fora**: Embrapa Gado de Leite, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa>>. Acesso em: 30 dez. 2011.
- ESTEPAR, J.; SANCHEZ, M. M.; ALONSO, L. et al. Biochemical and microbiological characterization of artisanal ‘Penã Mellera’ cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 737-746, 1999.
- ESTEPAR, J.; SANCHEZ, M. M.; ALONSO, L. et al. Biochemical and microbiological characterization of artisanal ‘Penã Mellera’ cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 737-746, 1999.
- EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. **International Journal Systematic Bacterial.**, Last full update: January 18, 2012. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature). Disponível em:< [ttp://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html)>. Acesso em: 13 jan. 2013.

FARIA, L. M. **Perfil microbiológico do queijo Minas fresco e após maturação de 30 e 60 dias em câmara fria produzido a partir de leite cru na região do Serro em Minas Gerais**. 2003. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista Leite e Derivados**, ano XIII, n. 76, p. 91-96. mar./abr. 2004.

FERREIRA, E. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Implicações da madeira na identidade e segurança de queijos artesanais. **Revista de Laticínios Cândido do Tostes**, v. 381, n. 66, p. 13-20, 2011.

FLÓREZ, A. B.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A. M.; BALTASAR MAYO, I. M. Biochemical and microbiological characterization of artisan kid rennet extracts used for Cabrales cheese manufacture. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 605-612, 2006.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: An Overview. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; Fox P. F. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. London: Academic Press, v. 1, 2004. p. 1-18.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

GILLIGAN, K.; SHIPLEY, M.; STILES, B.; HADFIELD, T. L.; IBRAHIM, M. S. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 71-78, 2000.

GUCUKOGLU, A.; KEVENK, T. O.; UYANIK, T. et al. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 11, p. 620-623, 2012.

HESELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dog, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, Utrecht, v. 45, n. 1, p. 11-17, Jan. 1995.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, V.; KALINÁCOVÁ, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Dublin, v. 9, n. 3, p. 179-182, Mar. 2002.

HUNT, K. ; SCHELIN, J.; RADSTROM, P.; BUTLER, F.; JORDAN, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. **Dairy Science & Technology**, v. 92, n. 5 (special Issue), p. 487-499, 2012.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria no 517, de 14 junho de 2002. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal. Portaria no 518, de 14 de junho de 2002. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal. Portaria

no 523, de 3 de julho de 2002. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal, 2002.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Região do Campo das Vertentes é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2009. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acesso em: 30 dez. 2011.

JAKOBSEN, R. A.; HEGGEBØ, R.; SUNDE, E. B.; SKJERVHEIM, M. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. **J. Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 492-496. 2011.

JAMESON, J. F. A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment. **Journal Hygiene**, v. 60, p. 193-207, 1962.

JAY, J. M.. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre, Artmídia, 2005. 711p.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; ROVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 158-167, 2005.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas frescal produzidos em Uberlândia – MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

KONGO, J. M.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X. et al. Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge - a raw milk cheese from the Azores (Portugal). **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 131-138, 2009.

KUMAR, J. D.; NEGI, Y. K.; GAUR, A.; KHANNA, D. Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 450-455, 2009.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **APHA**, Washington, USA, p. 387-403, 2001.

LEANDRO, J. J. **Queijos: do campo à mesa**. São Paulo: Melhoramentos, v. 1, 2008. 176 p.

LEITE, M. O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado**. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

LIMA FILHO, R. R.; POMBO, G. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite**, v. 6, n. 105, 2010.

LIMA, A. F. *Staphylococcus* coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho. Fortaleza, 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, [s.i], v. 2, n. 1, p. 63-76, Mar. 2003.

MACEDO, A. C.; COSTA, L. M.; MALCATA, F. X. Changes in the microflora of Serra cheese: evolution through ripening time, lactation period and axial location. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 79-94, 1996.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 153-161, 2003.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MAS, M.; TABLA, R.; MORICHE, J. et al. Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. **Le Lait**, v. 202, p. 579-587, 2002.

MCLAUGHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.

MCSWEENEY, P. L. H.; OTTOGALLI, G.; FOX, P. F. Diversity of cheese varieties: an overview. In: Fox, P. F. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. **Academic Press**, v. 2, p. 1-23, 2004.

MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GASPARD, C. E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 537-544, 1998.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei no 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acesso em: 30 dez. 2011.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 1.022 de 03 de novembro de 2009. **Identifica a microrregião do Campo das Vertentes**. Belo

Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2009. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acesso em: 30 dez. 2011.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Vet. Microbiol.**, v. 124, p. 66-72, 2007.

MOR-MUR, M.; CARRETERO, C.; PLA, R.; GUAMIS, B. Microbiological changes during Ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. **Food Microbiology**, n. 11, p. 177-185, 1994.

NAIK, S.; SMITH, F.; HO, J.; CROFT, N. M.; DOMIZIO, P.; PRICE, E.; SANDERSON, I. R.; MEADOWS, N. J. Staphylococcal enterotoxins G and I, a cause of severe but reversible neonatal enteropathy. **Clinical Gastroenterol.**, v. 6, p. 251-254, 2008.

NAJERA-SANCHES, G.; MALDONADO-RODRIGUEZ, R.; OLVERA, P.R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 6, p. 1055-1062, 2003.

NÓBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo Minas artesanal produzido na Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, p. 26-30, 2008.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 1429-1449, 2003.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para a caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *S. aureus* enterotoxin L. **Infection and immunity**, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

OTERO, A.; GARCIA, M. C.; GARCIA, M. L.; MORENO, B. Effect of a commercial starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* and thermonuclease and enterotoxins (C1 and C2) production in broth cultures. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 6, p. 107-114. 1988.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 145-148, 2009.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; DE OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G. C. Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos. Juiz de Fora-MG: **Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda.**, 2001. 190 p.

- PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 171-175, 2001.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278-282, 2009.
- PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; TEIXEIRA, I. S. C.; LIMA, S. I.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto – SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, [s.i.], v. 63, n. 2, p. 232-237, jul./dez. 2004.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300. 2004.
- PIMBLEY, D. W.; PATEL, P. D. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. **Journal Appl Microbiol.**, v. 84, p. 98-109, 1998.
- PIMENTEL FILHO, N. J.; MARTINS, J. M.; CUNHA, L. R.; LOPES, J. P.; FERNANDES, P. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Modulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio, no fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 295-298, 2005.
- PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria sp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. 2008. 71 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- PINTO, M. S.; PIRES, A. C. S.; PAULA, J. C. J.; FURTADO, M. M. Índice de *Staphylococcus sp.* e *Escherichia coli* em queijos artesanais produzidos no Brasil e na Europa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 331-334, 2005.
- PITOMBO, L. H. Na França, queijos com história e qualidade. **Balde Branco**, v. 44, n. 530, p. 48-53, 2008.
- POLI, M. A.; RIVERA, V. R.; NEAL, D. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. **Toxicon**, v. 40, p. 1723-1726. 2002.
- PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, p. 575-582, 2003.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J.B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp e *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 60-65, 2002.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. S. Detecting the enterotogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 946-950. 1974.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Jan./Feb. 2002.

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 de Biologia**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SCHEERER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, n. 101, p. 101-107, 2004.

SCHLIEVERT, P. M.; CASE, L. C. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. **Methods Molecular Biology**, v. 391, p. 113-126, 2007.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE**. 2000. 75f. 2000. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SEO, K. S.; BOHACH, G. A. Staphylococcal food poisoning. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. **Pathogens and toxins in foods**. Washington, DC: ASM Press, p. 119-130, 2010.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

SILVA, J. G. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.

TASCI, F.; SAHINDOKUYUCU, F.; OZTURK, D. Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese

consumed in Burdur Province. **African Journal of Agricultural Research**. v. 6, n. 4, p. 937-942, 2011.

USDA – United States Department of Agriculture/ Foreign Agricultural Service - Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA – Dairy: World Markets and Trade. 2012. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2012.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTNS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev. 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 373-378, Mar. 1996.

WIENEKE, A. A. Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreak of food poisoning. **Int. J. Food Microbiology**. v. 14, p. 305-312, 1991.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. **Staphylococcal Food Poisoning**. Foodborne Diseases. 2. ed. Elsevier, 2002.

ZAMFIR, M.; VANCANNEYT, M.; MAKRAS, L. et al. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, 2005.

ZANNONI, M. Evolution of the sensory characteristics of Parmigiano–Reggiano cheese to the present day Original. **Research Article Food Quality and Preference**, v. 21, p. 901-905, 2010.

ZÁRATE, V.; BELDA, F.; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 635-641, 1997.

ZOCHE, F.; BASTOS, C. P.; SILVA, W. P. Detecção de genes do cluster *egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1134-1140, 2010.

ANEXOS

ANEXO I

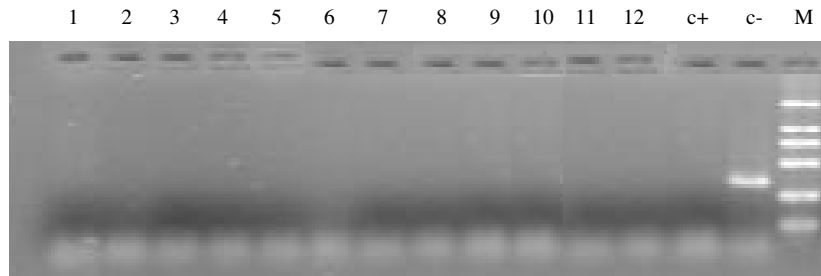


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* SEA1 e SEA2 para o gene *sea* específico da enterotoxina estafilocócica SEA. Coluna 1 a 12: isolado negativos para o gene *sea*. Coluna C+: controle positivo gene *sea* (*S. aureus* ATCC 13565); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

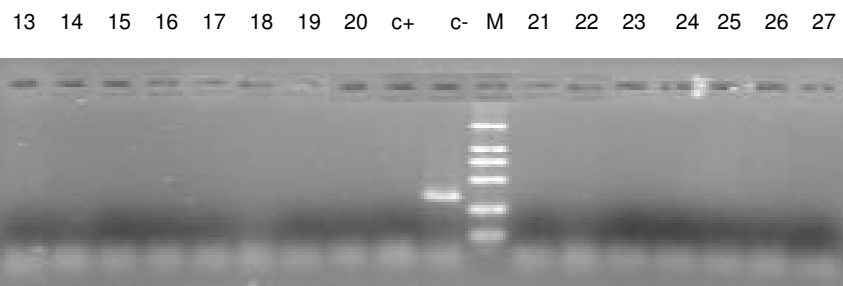


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* SEA1 e SEA2 para o gene *sea* específico da enterotoxina estafilocócica SEA. Coluna 13 a 27: isolado negativos para o gene *sea*. Coluna C+: controle positivo gene *sea* (*S. aureus* ATCC 13565); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

28 29 30 31 32 33 34 35 c- c+ M 36 37 38 39 40 41 42 43 44

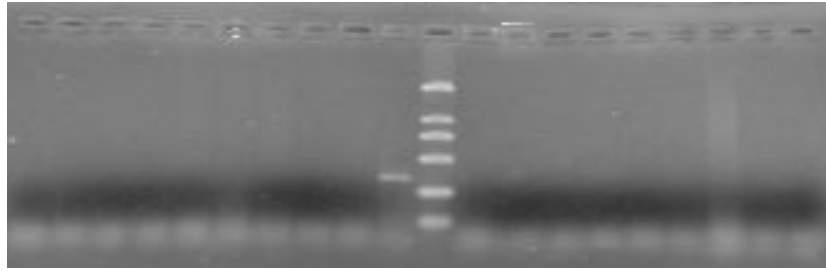


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* SEA1 e SEA2 para o gene *sea* específico da enterotoxina estafilocócica SEA. Coluna 28 a 44: isolado negativos para o gene *sea*. Coluna C+: controle positivo gene *sea* (*S. aureus* ATCC 13565); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

1 2 3 4 5 6 7 8 c- c+ M 9 10 11 12 13 14 15

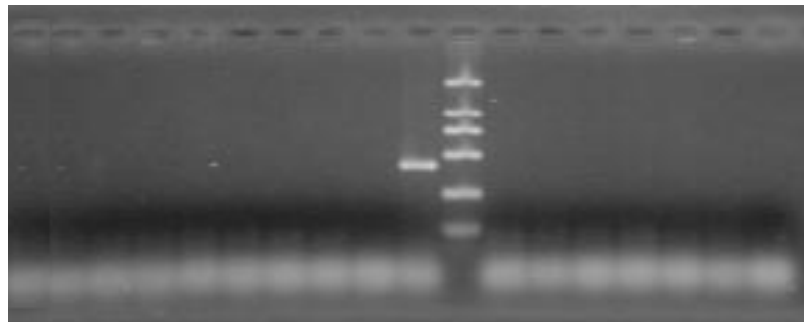


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os *primers* SEB1/ SEB2 para o gene *seb* específico da enterotoxina estafilocócica SEB. Coluna 1 a 15: isolados negativos para o gene *seb*. Coluna C+: controle positivo gene *seb* (*S. aureus* ATCC 14458). Coluna c-: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

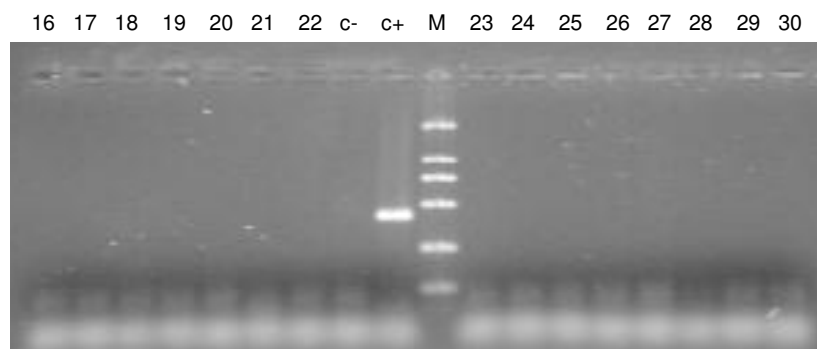


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os primers SEB1/ SEB2 para o gene seb específico da enterotoxina estafilocócica SEB. Coluna 16 a 30: isolados negativos para o gene seb. Coluna C+: controle positivo gene seb (*S. aureus* ATCC 14458). Coluna c-: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

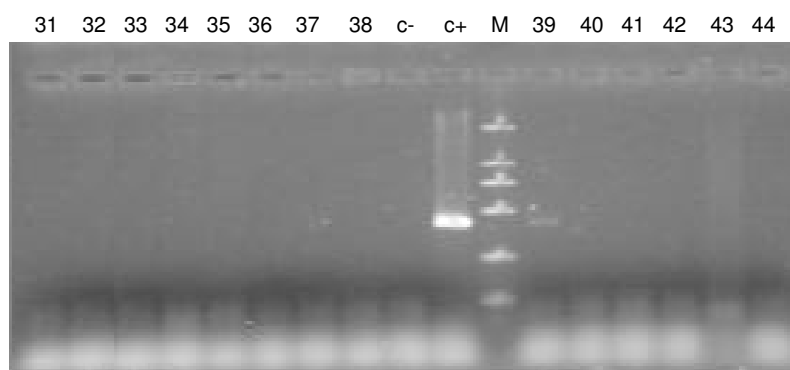


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os primers SEB1/ SEB2 para o gene seb específico da enterotoxina estafilocócica SEB. Coluna 31,32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43 e 44: isolados negativos para o gene seb. Coluna 39: isolado positivo para o gene seb. Coluna C+: controle positivo gene seb (*S. aureus* ATCC 14458). Coluna c-: controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

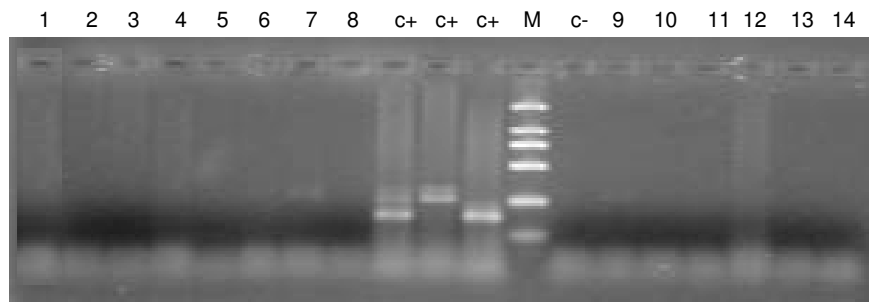


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os primers SEC1/ SEC2 e SEE1/ SEE2 para os genes sec e see específicos das enterotoxinas estafilocócicas SEC e SEE. Coluna 1 a 14: isolados negativos para o gene sec; coluna 1 a 14: isolados negativos para o gene see. Coluna C-: controle negativo da reação. Coluna c+: controle positivo gene sec (*S. aureus* ATCC 19095). Coluna c+: controle positivo para o gene see (*S. aureus* ATCC 27664). Coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

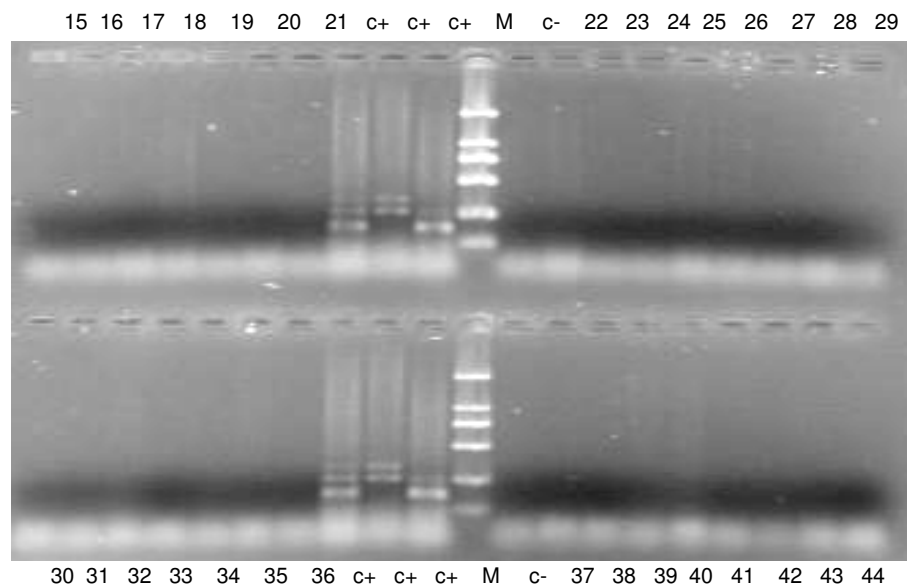


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR amplificados com os primers SEC1/ SEC2 e SEE1/ SEE2 para os genes sec e see específicos das enterotoxinas estafilocócicas SEC e SEE. Coluna 1 a 14: isolados negativos para o gene sec; coluna 15 a 44: isolados negativos para o gene see. Coluna C-: controle controle negativo da reação. Coluna c+: controle positivo gene sec (*S. aureus* ATCC 19095). Coluna c+: controle positivo para o gene see (*S. aureus* ATCC 27664). Coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

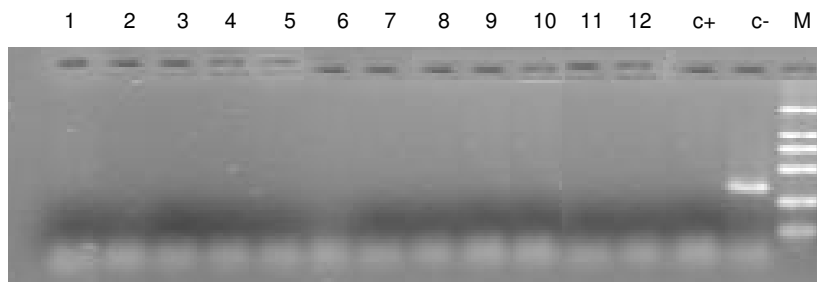


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers SED1 e SED2 para o gene sed específico da enterotoxina estafilocócica SED. Coluna 1 a 12: isolado negativos para o gene sed. Coluna C+: controle positivo gene sed (*S. aureus* ATCC 23235); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

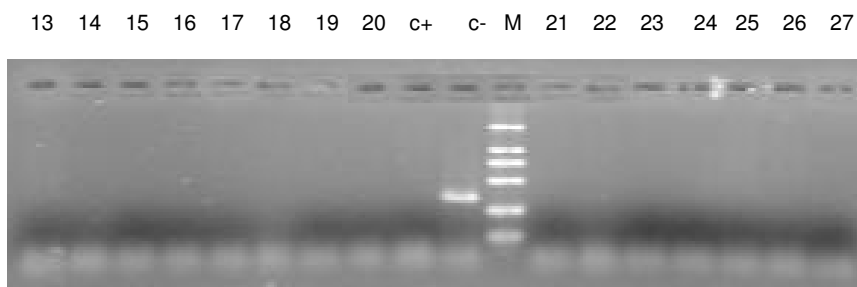


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers SED1 e SED2 para o gene sed específico da enterotoxina estafilocócica SED. Coluna 1 a 12: isolado negativos para o gene sed. Coluna C+: controle positivo gene sed (*S. aureus* ATCC 23235); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

28 29 30 31 32 33 34 35 c- c+ M 36 37 38 39 40 41 42 43 44

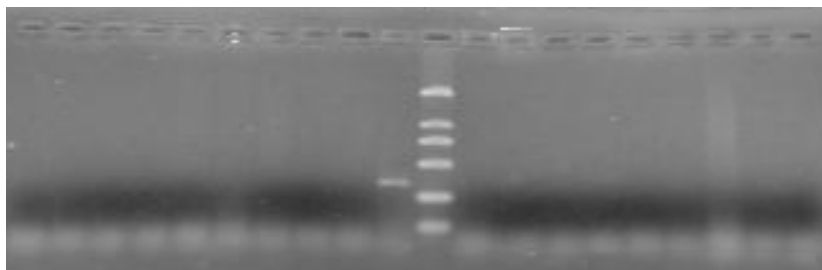


Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers SED1 e SED2 para o gene sed específico da enterotoxina estafilocócica SED. Coluna 1 a 12: isolado negativos para o gene sed. Coluna C+: controle positivo gene sed (*S. aureus* ATCC 23235); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).

18 19 20 21 22 23 24 25 c- M c+ 26 27 28 29 30 31 32 33 34

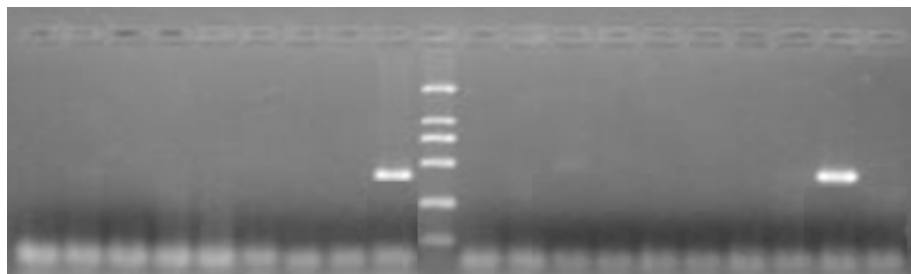


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers SEG1 e SEG2 para o gene seg específico da enterotoxina estafilocócica SEG. Coluna 18 a 34: isolado negativos para o gene seg. Coluna C+: controle positivo gene seg (*S. aureus* ATCC 19095); coluna c- controle negativo da reação e coluna M: marcador de peso molecular (Amersham, 100pb).