



IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM AMOSTRAS DE QUEIJO DO TIPO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE MARINGÁ/PR

*Fabiana Alves Calderani*¹; *Cintia Corteccioni Nunez Del Prado*²; *Adriana Danmvolf Ribas*³

RESUMO: O queijo Minas Frescal é amplamente consumido pela população brasileira, podendo ser produzido a partir de leite pasteurizado ou leite cru, por ser um queijo artesanal e de fácil produção muitas vezes não há rigor quanto à higiene necessária por parte dos manipuladores ou quanto à procedência do leite utilizado para a sua fabricação. Desta forma, esse alimento lácteo pode tornar-se um potente veículo de disseminação de bactérias causando riscos à saúde dos consumidores. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria comumente associada a casos de infecções alimentares por possuir linhagens produtoras de enterotoxinas pré-formadas e tem sido comumente encontradas em queijos. Para obter confiabilidade dos resultados serão coletadas amostras de queijo Minas Frescal de diferentes pontos de venda na cidade de Maringá/PR, com posterior análise das amostras através de diluições seriadas e inoculações em meio próprio para o crescimento de *S. aureus* constatando assim a qualidade microbiológica do queijo, com os resultados obtidos será possível observar se a maneira de produção deste alimento está sendo realizada de maneira segura para os consumidores.

PALAVRAS-CHAVE: Enterotoxinas; Intoxicação Alimentar Estafilocócica; *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias *Staphylococcus aureus* estão frequentemente associadas a doenças estafilocócicas, sejam essas de origem alimentar ou não (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Embora outras espécies de *Staphylococcus* spp. também estejam associadas a surtos de infecção alimentar, *S. aureus* é a espécie frequentemente associada devido a sua alta capacidade de produção de enterotoxinas (OMOE et al., 2005).

A infecção alimentar é causada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado, essa contaminação ocorre devido à manipulação humana inadequada, sem seguir os padrões básicos higiênico-sanitários (LEBEAU, 1994).

Segundo Pereira *et al.* (2001), o queijo é um dos alimentos mais contaminados. Quando consumido em condições inadequadas, pode ser prejudicial para a população, podendo ocasionar surtos de infecção alimentar, causando de maneira geral um problema de saúde coletiva (GONÇALVES; FRANCO, 1996).

Quando cepas enterotoxigênicas replicam em números superiores a 105 UFC/mL, podem produzir enterotoxinas. Bactérias estafilocócicas são eliminadas através do

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do UNICESUMAR (PICC). fabianacalderani@gmail.com

² Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. cintiadelp Prado@hotmail.com

³ Orientadora, Professora Mestre do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR. adriana.ribas@cesumar.br

processo de pasteurização, porém, queijos feitos a partir de leite cru não são pasteurizados o que permite a presença do patógeno (HUDSON, 2010).

No Brasil, diversos surtos de infecção alimentar com alimentos contendo o *Staphylococcus aureus* têm sido notificados. Muitos trabalhos realizados demonstram que a contaminação do queijo Minas Frescal por patógenos tem sido observada em diversas cidades do Brasil, o que compromete a qualidade do produto (CAVALCANTE et al., 2007).

Segundo SILVA (2001), podem ser feitas análises microbiológicas de alimentos para identificação do *S. aureus* através da contagem direta em placas, já que geralmente alimentos envolvidos em surtos apresentam grande população da bactéria, não exigindo métodos altamente sensíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, será feita a coleta de 50 amostras de queijo Minas Frescal, de diferentes pontos de vendas em Maringá, as amostras serão acondicionadas em embalagens estéreis para evitar qualquer tipo de contaminação externa. A metodologia utilizada será de acordo com Silva (2001).

Antes de abrir as embalagens, estas serão desinfetadas com álcool 70% com o objetivo de eliminar possíveis contaminantes ali presentes, será retirado de maneira asséptica 25 g da amostra de queijo que será posteriormente transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado e tarado, para então ser feita a homogeneização e diluição. Os procedimentos de limpeza e retirada da amostra serão feitos em cabine de fluxo laminar e os materiais utilizados serão previamente autoclavados.

Na análise de queijo o diluente utilizado será a água peptonada, a homogeneização será feita por trituração em liquidificador com rotação de 8000 a 15000 rpm e se demorar mais do que 2 minutos, o diluente deve ser pré-refrigerado antes de sua adição para eliminar a quantidade de calor gerada, após a homogeneização será feita uma diluição de 1:10, adicionando-se as 25g da amostra juntamente com 225 mL do diluente adequado, ressaltando que o tempo entre a homogeneização e das diluições posteriores não deve ultrapassar 3 minutos.

Para a preparação da segunda diluição, será transferido asepticamente 1 mL da diluição anterior para 9 mL de diluente, as posteriores diluições serão feitas da mesma maneira, sendo que pode-se transferir 1 ou 10 mL da diluição anterior para 9 ou 90 mL de diluente. Serão realizadas 3 diluições seriadas para a obtenção de placas com contagens entre 25 e 250 colônias.

Depois, das 3 diluições serão inoculados 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas de Ágar Baird Parker suplementado com gema de ovo e telurito de potássio, através de uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Após a inoculação, deve-se aguardar que as placas sequem completamente para serem incubadas invertidas a 35°C por 48 horas. Transcorrido esse período, serão selecionadas placas com 20 a 200 colônias típicas de *S. aureus* que são colônias pretas, circulares, pequenas, lisas, convexas, com bordas esbranquiçadas e perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente.

As colônias típicas (no mínimo cinco) serão selecionadas e serão realizados testes de coagulase, coloração de gram, catalase e DNase como teste confirmatório para amostras duvidosas. Serão consideradas como *S. aureus* as culturas com reação de coagulase de níveis 3 e 4 ou as culturas com reação de coagulase de níveis 1 e 2, porém com reação de catalase positiva além de coloração Gram positiva em forma de cachos de

uva. O número de UFC/g será calculado em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e porcentagem de colônias formadas.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se detectar *Staphylococcus aureus* em amostras de queijos Minas Frescal coletadas em Maringá/PR, para verificação se estes estão de acordo com os padrões legais estabelecidos pela ANVISA conforme resolução nº 12 de 2 de Janeiro de 2001 que estabelece limite de $5,0 \times 10^2$ UFC/g para queijo Minas Frescal sem a adição de bactérias lácticas, se constatado valores acima deste, isso indica contaminação do alimento com possibilidades de formação de enterotoxinas pelas bactérias presentes.

Almeja-se que o presente estudo contribua para a sociedade alertando sobre a necessidade de correta produção do alimento, dentro das normas estabelecidas, visando à segurança da saúde dos consumidores.

4. REFERÊNCIAS

CAVALCANTE, J. F. M.; et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, p. 205-214, 2007.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, Niterói, v. 3, n. 1, p. 5-9, jan./abr. 1996.

HUDSON, J. A. **Evaluation of methods for detection of coagulase positive *Staphylococcus* and Staphylococcal toxin in Milk and cheese**. Food Safety Programme Leader. 2010. 37p.

LEBEAU et al. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agar-dependent mechanism. **J. Bacteriol.**, v.176, p.5534-5536. 1994.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.

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**. Campinas, v. 21, n. 2, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 317 p.