

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**PESQUISA DE *Staphylococcus* Coagulase Positiva
PRODUTOR DA TOXINA 1 DA SÍNDROME DO
CHOQUE TÓXICO (TSST-1) EM AMOSTRAS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL**

MÔNICA COSTA LOPES SANTIAGO

BELO HORIZONTE

2019

MÔNICA COSTA LOPES SANTIAGO

**PESQUISA DE *Staphylococcus* Coagulase Positiva
PRODUTOR DA TOXINA 1 DA SÍNDROME DO
CHOQUE TÓXICO (TSST-1) EM AMOSTRAS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL**

Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Souza Dias.

BELO HORIZONTE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**PESQUISA DE *Staphylococcus* Coagulase Positiva
PRODUTOR DA TOXINA 1 DA SÍNDROME DO CHOQUE
TÓXICO (TSST-1) EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS
ARTESANAL**

Mônica Costa Lopes Santiago

Belo Horizonte, 25 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Souza Dias
(ORIENTADOR)

Dra. Aline Daniela Lopes Júlio
(MEMBRO)

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu forças para seguir em frente sempre, mesmo quando achei que não seria capaz.

Ao meu marido Adilson pelo incentivo e paciência sempre, aos meus filhos Pedro e Laura, aos meus pais e irmãos.

Aos colegas de curso pelos momentos difíceis e divertidos, aos professores por toda a dedicação ao seu trabalho em nos ensinar.

Ao meu orientador Professor Ricardo Dias pela dedicação, orientação e paciência em todos os momentos.

RESUMO

Staphylococcus aureus se destaca como um dos principais microrganismos causadores de infecção, tanto no homem como em animais. Entre os animais destaca-se a mastite bovina, doença resultante da inflamação da glândula mamária. O microrganismo possui vários fatores de virulência que contribuem para sua colonização, dentre eles a produção da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Em humanos pode ocasionar febre, exantema, hipotensão e o comprometimento de múltiplos órgãos. A atividade superantigênica da TSST-1 pode contribuir para a evolução da mastite animal comprometendo a qualidade do leite produzido, matéria-prima utilizada na elaboração de produtos lácteos, em especial queijos. Assim o Queijo Minas Artesanal (QMA), produzido a partir do leite cru, pode se tornar um potencial veículo de agentes patogênicos e, conseqüentemente, contribuir com a disseminação de linhagens de *Staphylococcus* produtoras de TSST-1 entre a população consumidora. A fim de verificar tal possibilidade foram analisadas amostras de QMA produzidas nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra. Foram isoladas 25 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva provenientes de 25 produtores. A capacidade dos isolados de produzir a toxina foi avaliada pelo método de Optimum Sensitive Plate (OSP), quanto as características das amostras analisadas, o tempo de cura foi em média, de 22 dias e a maioria maturados sob refrigeração. A análise dos resultados revelou que, dos 25 pequenos produtores avaliados, 21 produziam Queijo Minas Artesanal que não atendiam à tolerância máxima estabelecida pela Legislação vigente quanto ao parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva (máximo 10^3 UFC/g) e, das amostras que não atendiam o padrão, 9 eram potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar por apresentarem contagem superior a 10^5 UFC de *Staphylococcus* coagulase positiva/g. Embora tenha-se obtido elevada contagem do microrganismos, que pode ser resultante da má qualidade da matéria-prima utilizada, da utilização do leite não pasteurizado, como também possíveis falhas nas boas práticas de fabricação, nenhum dos isolados era produtor de TSST-1. Isso demonstra que as amostras de queijo, das microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra apresentam baixo risco de disseminação de linhagens produtoras de TSST-1, entre a população consumidora.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, TSST-1, Mastite Animal, Queijo Minas Artesanal.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus stands out as one of the main microorganisms causing infection, both in humans and animals. Among the animals the bovine mastitis, a disease resulting from inflammation of the mammary gland. The micro-organism has several virulence factors that contribute to your settlement, among them the Toxin production of toxic shock syndrome 1 (TSST-1). In humans can cause fever, skin rash, hypotension and multiple organ involvement. The superantigênica activity of TSST-1 may contribute to the evolution of animal mastitis compromising the quality of milk produced, raw material used in the production of dairy products, especially cheese. Thus the Artisan Minas cheese, made from raw milk, can become a potential vehicle of pathogens and thereby contribute to the spread of *Staphylococcus* strains producing TSST-1 between the consumer population. In order to verify such a possibility were analyzed samples of Artisan Minas cheese produced in micro-regions of Serro, Cerrado and Canastra. Were isolated 25 sample *Staphylococcus* coagulase positive from 25 producers. The ability of the isolates to produce the toxin was evaluated by the method of Optimum Sensitive Plate (OSP), as the characteristics of samples analysed, the healing time was on average 22 days and most matured under refrigeration. The analysis of the results showed that, of the 25 small producers evaluated, 21 produced Artisan Minas cheese that did not meet the maximum tolerance established by current legislation regarding coagulase positive *Staphylococcus* parameter (max 10^3 CFU/g) and , which samples did not meet the standard, 9 were potentially capable of causing food poisoning for presenting more than 10^5 CFU/g count of coagulase positive *Staphylococcus*/g. Although have obtained high count of the microorganisms, which can be as a result of the poor quality of the raw material used, the use of unpasteurized milk, as well as potential failures in good manufacturing practices, none of the isolates was producer of TSST-1. This demonstrates that the cheese, samples of the micro-regions of Serro, Cerrado and Canasta low risk of dissemination of TSST-1-producing strains, among the consumer population.

Key words: *Staphylococcus*, TSST-1, Animal Mastitis, Artisanal Minas Cheese.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Furúnculo estafilocócico.....	17
FIGURA 2 – Úbere acometido pela mastite clínica.....	17
FIGURA 3 - Regiões tradicionalmente produtoras do Queijo Minas Artesanal.....	25
FIGURA 4 - Divisão territorial da Serra da Canastra.....	26
FIGURA 5 - Mapa da Região do Serro, divisão territorial dos municípios.....	27
FIGURA 6 - Apresentação cartográfica da Região Alto das Vertentes.....	28
FIGURA 7 - Municípios que compõem a região de Cerrado.....	28
FIGURA 8 - Municípios que compõem a Região do Araxá.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tempo e temperatura de maturação de queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões do Serro, Cerrado Canastra e Guanhães no período de 2017 e 2018.....	37
TABELA 2 - Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em amostras de Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra no período de 2017 e 2018.....	38
TABELA 3 - Qualidade microbiológica dos queijos Minas Artesanal, fabricados por pequenos produtores localizados em diferentes microrregiões de Minas Gerais no período de 2017 e 2018.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

EMATER - EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL

FAPEMIG - FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

IMA - INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA

PBS - PHOSPHATE BUFFERED SALINE

QMA - QUEIJO MINAS ARTESANAL

RDC- RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA

SST - SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO

TSST – 1 - TOXINA 1 DA SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO

UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral	13
1.1.2 Objetivos Específicos	13
1.2 JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	15
2.1.1 Características do microrganismo	15
2.1.2 <i>Staphylococcus</i> spp. causadores de doenças em animais e humanos.....	16
2.1.3 <i>Staphylococcus</i> spp. e fatores de virulência.....	16
2.2 MASTITE BOVINA	19
2.2.1 Definição	19
2.2.2 Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico: conceito e mecanismo de ação.....	20
2.3 PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE	22
2.3.1 Queijo Minas Artesanal	23
2.3.2 Legislação Queijo Minas Artesanal.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS 333	
3.1 Obtenção e metodologias de análise das amostras de Queijo Minas Artesanal.....	33
3.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	34
3.3 Verificação da produção de TSST-1 dos isolados	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÃO	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de humanos e animais por microrganismos patogênicos tem tido destaque na literatura, especialmente pelos problemas causados aos hospedeiros, assim como pela dificuldade de se evitar a proliferação desses agentes quando encontram condições adequadas para o seu desenvolvimento, sobretudo condições ambientais.

Dentre os microrganismos causadores de infecções em animais com possível transmissão para humanos destacam-se as bactérias do gênero *Staphylococcus*, as quais apresentam características que permitem classificá-las em diferentes espécies. Dentre elas *Staphylococcus aureus* que é comumente conhecida pela capacidade potencial de causar infecções em humanos e rebanhos bovinos.

S. aureus está entre os principais microrganismos causadores da mastite bovina, uma infecção que se caracteriza por uma inflamação da glândula mamária, resultando em um quadro clínico ou sub-clínico, que compromete a qualidade do leite utilizado na produção de queijos. A presença de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* pode resultar na produção de enterotoxinas capazes de desencadear surtos de intoxicação alimentar. A enfermidade é caracterizada por diarreia, vômito, dores de cabeça, náuseas, dores abdominais e sudorese. O período de incubação pode variar de 30 minutos até 8 horas, mas na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (RODRIGUES et. al., 2004).

Dentre os fatores de virulência que contribuem com a habilidade do microrganismo de colonizar a glândula mamária e desenvolver o processo inflamatório destaca-se a Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Essa toxina é um polipeptídeo de cadeia simples de 22 kDa, não glicosilada, sem pontes dissulfídicas com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas e superantigênicas (GAMPFER et al., 2002; DINGES et al., 2000).

Em seres humanos, a TSST-1 possui forte associação com o período menstrual, como também pode ocorrer após uma cirurgia por infecção do local onde foi realizada a cirurgia. Os sinais e sintomas incluem febre, erupção cutânea, descamação e hipotensão. Considera-se, também, que a TSST-1 tem um papel crucial na síndrome de Kawasaki, na dermatite atópica e doença exantemataosa semelhante a Síndrome do Choque Tóxico (SST) neonatal (GAMPFER et al., 2002).

Os primeiros relatos dos sintomas em humanos, foram observados em estudos realizados por Todd et al. (1978), quando observaram sete crianças, sendo quatro meninas e três meninos com idade entre 8 e 17 anos. Elas apresentavam sintomas idênticos como febre alta, vômito, diarreia, erupção cutânea, baixa pressão sanguínea, descamação da pele das palmas das mão e pés, envolvimento multissistêmico. Os sintomas eram apresentados entre 7 a 10 dias após o início da doença. Foi observado que todos os pacientes tiveram descamação das palmas das mão e planta dos pés. Um paciente teve gangrena dos dedos dos pés, e houve óbito de um paciente.

A colonização da glândula mamária por *Staphylococcus* spp compromete a qualidade do leite produzido trazendo risco à saúde do homem que o consome tanto a forma *in natura* quanto na forma de derivados como queijo. A qualidade do queijo também é comprometida quando não há o emprego de boas práticas de higiene na sua fabricação ou quando não são maturados por período suficiente para o efeito desejado (SOARES et al., 2018). O queijo mineiro, em especial o Queijo Minas Artesanal apresenta grande aceitabilidade entre os consumidores, além de possuir extrema importância econômica para o estado, devido à geração de renda para os pequenos produtores da Agricultura Familiar (BEZERRA 2010; DORES; FERREIRA, 2012).

Apesar disso, poucos são os estudos relacionados à produção de TSST-1 por linhagens de *Staphylococcus* isoladas de alimentos, em especial de amostras de queijo.

Diante do exposto o presente trabalho se propõe a avaliar se o consumo do QMA produzido nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra apresenta um potencial

risco, de disseminar linhagens de *Staphylococcus* produtoras de TSST-1, entre a população consumidora do QMA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Caracterizar o potencial risco de disseminação de linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, produtoras da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico entre membros da população das microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra, por meio do consumo de Queijo Minas Artesanal.

1.1.2 Específicos

- Coletar amostras de queijo de propriedades queijeiras localizadas em diferentes municípios mineiros.
- Avaliar a qualidade microbiológica das amostras coletadas, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente RDC N°12.
- Testar a capacidade de produção da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico pelas linhagens de *Staphylococcus* selecionadas.
- Avaliar a distribuição de linhagens de *Staphylococcus* produtoras de Toxina 1 nas amostras de queijo artesanal coletadas nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra.

1.2 JUSTIFICATIVA

Embora a ocorrência da Síndrome do Choque Tóxico seja de causas múltiplas pouco se sabe sobre a Síndrome do Choque Tóxico estafilocócica no Brasil e as principais fontes de disseminação de linhagens de *Staphylococcus* produtoras de TSST-1 entre a população. Considerando ainda a natureza do Queijo Minas Artesanal , ser elaborado a partir de leite cru e a elevada presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nesse produto acredita-se que o queijo possa ser um potencial veículo de disseminação entre a população de linhagens produtoras de TSST-1 , podendo contribuir com a ocorrência de episódios de choque tóxico, pouco diagnosticado em nosso meio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus* spp.

2.1.1 Características do microrganismo

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae, ordem Bacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes. Foi descrito pela primeira vez no ano de 1878 por Robert Kock, que o isolou em material purulento em um de seus pacientes. Em 1880, o cirurgião escocês, Alexander Ogston, associou o gênero a um grande número de doenças piogênicas que acometiam o homem (BAIRD-PARKER, 1990).

Segundo Euzéby (2012), este gênero é composto por 47 espécies e 24 subespécies, subdivididos em dois grupos conforme sua capacidade de produzir a enzima coagulase. As principais espécies coagulase positiva são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* e *S. lutrae*. Cerca de metade das espécies de estafilococos coagulase-negativa coloniza naturalmente o homem, incluindo-se dentre eles *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. pasteurii*, *S. vitulinus*, *S. pettenkoferi* (Euzéby, 2011).

Staphylococcus são classificados, de acordo com a sua afinidade aos corantes básicos utilizados na técnica de coloração de gram, como bactérias gram-positivas, em forma de cocos, isolados ou em pares, tétrades ou cachos. São anaeróbias facultativas, pois vivem em meios aeróbios utilizando oxigênio, mas podem viver facultativamente, em meios anaeróbios por meio da fermentação (BAIRD-PARKER, 1990). Não produzem esporos, são imóveis e produtoras da enzima catalase. Em meio de cultura sólido, as colônias do gênero se apresentam de forma circular, com uma coloração branca ou alaranjada que varia de acordo com a espécie. Essas bactérias se caracterizam como halofílicas, podendo resistir a uma concentração de até 15% de cloreto de sódio (KLOSS, 1990).

São considerados microrganismos mesófilos, com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8°C e podem produzir enterotoxinas responsáveis por episódios de intoxicação alimentar e outros fatores de virulência relacionados a processos infecciosos como a Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico. Para o seu desenvolvimento, o pH ideal varia entre 7 a 7,5, mas é possível que ocorra sua proliferação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3 (PRADO et al., 2015). Devido a essas características o microrganismo apresenta a habilidade de se desenvolver em uma grande variedade de produtos alimentícios comprometendo a qualidade. Adicionalmente, pode tornar esses produtos alimentícios potencialmente capazes de causar surtos de intoxicação alimentar.

Geralmente, a intoxicação por *Staphylococcus* ocorre através da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria, a qual pode continuar viável ou não. A contaminação humana por esses agentes ou até mesmo pela toxina, pode trazer sérias complicações, levando o indivíduo a desenvolver doenças (PRADO et al., 2015).

2.1.2 *Staphylococcus* spp. causadores de doenças em animais e humanos

Em seres humanos, as bactérias do gênero *Staphylococcus* estão presentes na microbiota da pele, como também em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestino, dentre outras. A espécie *S. aureus* se destaca como a principal bactéria do gênero de interesse médico, pois o microrganismo está frequentemente relacionado a diversas infecções em seres humanos e em animais (KONEMAN et al., 2001; SANTOS et al., 2007). Nos seres humanos, *S. aureus* tem sido associado com conjuntivites, septicemias, osteomielite, furunculose e intoxicações alimentares (SANTOS et al., 2007).



FIGURA 1 - Furúnculo estafilocócico.

Fonte: Santos-Filho (2003).

Em bovinos, prevalece como um dos principais agentes etiológicos das mastites, causador de infecção das glândulas mamárias, resultando em um quadro de mastite. A mastite causa prejuízos na pecuária leiteira, ocasionando a redução da produtividade do rebanho e alterações físico-químicas do leite (SCHEGELOVÁ 2003; SANTOS et al., 2007).



FIGURA 2 - úbere acometido pela mastite clínica.

Fonte: Arquivos do Prof. Geraldo Márcio da Costa

Boletim Técnico UFLA - 2012

2.1.3 *Staphylococcus* spp. e fatores de virulência

Staphylococcus spp. são capazes de produzir vários fatores de virulência, os quais contribuem para que a bactéria invada as defesas do hospedeiro, facilite a sua aderência às células epiteliais e a colonização do tecido. Isso permite que a bactéria continue com sucesso o processo de infecção no hospedeiro (COELHO et al. 2009). Entre esses fatores está a produção de um mucopolissacarídeo extracelular (slime),

cuja função é possibilitar a aderência e colonização da bactéria no ambiente afetado. A habilidade de *Staphylococcus aureus* aderir à superfície do epitélio tem sido associada à produção de biofilmes, que podem ser definidos como comunidades de microrganismos que vivem aderidos a uma superfície e envoltos numa complexa mistura de compostos tais como proteínas, polissacáridos e DNA extracelular. O crescimento de microrganismos sob a forma de biofilmes dificulta a sua eliminação, sendo estas estruturas, uma forma que os microrganismos encontram de se adaptar e continuar no hospedeiro (HENRIQUES et al., 2013).

A coagulase é apontada como a primeira linha de defesa e principal responsável pela virulência dos estafilococos. Essa enzima promove a deposição de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro (MARTINEZ et al., 2001).

Alguns fatores de virulência de *Staphylococcus* estão associados à parede celular e são geralmente denominados de fatores de superfície ou somáticos. Tais fatores são importantes, principalmente, na interação do microrganismo com o hospedeiro durante o processo inicial de colonização (adesão e invasão), nos mecanismos de evasão das defesas e na modulação da resposta imune do hospedeiro. Além disso, esses microrganismos podem secretar uma ampla variedade de proteínas conhecidas como exoproteínas (SALYERS; WHITT, 2002).

No que diz respeito à evasão da resposta imunológica do hospedeiro, estão relacionadas a Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares. Relacionado à penetração nos tecidos ou adesão na célula do hospedeiro e superfícies de cateteres e próteses, incluem-se as proteínas (toxinas) α , β , δ , γ e δ - hemolisinas (SANTOS et al., 2007).

Staphylococcus podem produzir uma variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizar e causar doenças nos organismos hospedeiros. Quase todas as cepas podem produzir citotoxinas e enzimas como hemolisinas, proteases, nucleases, lipases e hialuronidase. A principal função dessas proteínas é

converter o tecido do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (DINGES et al., 2000).

A capacidade de *Staphylococcus* produzirem inúmeros fatores de virulência pode estar relacionada ao poder de adaptação e adesão das bactérias a diferentes hospedeiros em diversos locais no corpo à captação de nutrientes e à capacidade de evasão da resposta imune. (MARQUES et al., 2013).

2.2 MASTITE BOVINA

2.2.1 Definição

Mastite é definida como uma inflamação aguda ou crônica da glândula mamária, que atinge uma grande parte de ruminantes. Esse processo de inflamação tem causas variadas, como trauma ou lesão no úbere, irritação química, ou infecção causada por microrganismos. Como mecanismo de defesa para eliminar o microrganismo presente na infecção e neutralizar a ação das toxinas, a glândula mamária inicia uma reação inflamatória que ajuda a reparar os tecidos afetados e normalizar as suas funções. Dependendo da intensidade das reações do organismo do animal, será variável o grau de inflamação (QUIN et al., 2015).

A mastite pode ser classificada como clínica e subclínica dependendo da manifestação apresentada. Na mastite clínica, alguns sinais são visíveis, outros não. Em geral, o animal apresenta endurecimento e aumento de temperatura da glândula mamária, pus, formação de grumos e outras alterações do leite. Na mastite subclínica, o animal não apresenta sintomas. É possível observar alterações na composição do leite, como aumento na contagem de células somáticas, além da infecção promover outros sinais como febre, queda na produção do leite e diminuição do consumo de alimentos (SIMÕES; OLIVEIRA 2012).

Podemos classificar a mastite a partir da forma de contágio do animal, como mastite contagiosa ou ambiental. A primeira é causada por patógenos que são encontrados na pele, mucosas dos animais e mãos do ordenhador e a segunda por aqueles

patógenos que são encontrados principalmente no ambiente onde os animais são mantidos, incluindo todos os locais de manejo (LANGONI et al., 2017).

A mastite bovina destaca-se como a principal doença que prevalece entre os rebanhos leiteiros, gerando impacto na produtividade desses animais e aumentando os gastos com tratamento, que muitas vezes é realizado de forma incorreta. Por suas características, geram grandes perdas econômicas para os produtores e para a indústria (SOUZA et al., 2016).

2.2.2 Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico: conceito e mecanismo de ação

A TSST-1 foi descrita pela primeira vez em 1927, caracterizada por sintomas como febre, mialgia, dor de garganta, edema, erupção cutânea, hipotensão e descamação associada à colonização por *Staphylococcus aureus* (DeVries et al., 2011). Em 1978, Todd et al. ampliaram os estudos sobre esses sintomas, apresentando resultados mais consistentes. Os mesmos associavam os sintomas apresentados pelos pacientes com forte semelhança aos sintomas comuns a síndromes causadas por toxinas produzidas por *Staphylococcus*, como, por exemplo, a síndrome da pele escaldada.

Esse tipo específico de toxina constitui uma proteína de cadeia única de 22 kDa, não glicosilada e sem pontes dissulfídicas. É sintetizada com um peptídeo sinal de 40 aminoácidos na região amino terminal que é removido, sendo secretada como uma proteína madura de 194 aminoácidos (GAMPFER et al., 2002). Contém uma alta porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos, mas é altamente solúvel em água. Tais toxinas são extremamente resistentes a proteases, sendo estáveis a temperaturas superiores a 60°C, podendo ser fervida por mais de 1 hora sem perda detectável de atividade biológica. Possuem resistência a faixas de pH que variam entre 2.5 a 11. Em geral, essas toxinas não apresentam muitas sequências homólogas com outros superantígenos (DINGES et al., 2000).

A toxina age como um superantígeno, estimulando a proliferação e ativação de linfócitos T, o que leva à maior liberação de citocinas, sobretudo fator de necrose tumoral alfa e beta, interleucina-1 e interleucina-2. Essas citocinas provocam o

aumento da permeabilidade capilar e hipotensão, culminando com a falência de múltiplos órgãos (ALVAREZ; MIMICA, 2012).

Em seres humanos a TSST-1 possui forte associação com o período de menstruação, como também pode ocorrer após uma cirurgia por contaminação do sítio cirúrgico. Os sintomas incluem febre, erupção cutânea, descamação e hipotensão. Considera-se, também, que a TSST-1 tem um papel crucial na síndrome de Kawasaki, na dermatite atópica e doença exantematosa semelhante a Síndrome do Choque Tóxico (SST) neonatal (GAMPFER et al., 2002).

A mastite bovina é, certamente, um caso propício para gerar intoxicações em humanos. Isso porque, o leite constitui em excelente substrato para a proliferação desses microrganismos e a temperatura da glândula mamária é ideal para a produção de enterotoxinas em concentrações suficientes para causar a doença no homem (NADER FILHO et al., 2007). Diversos estudos têm realizado procedimentos de isolamento dessa toxina do leite de bovinos, sobretudo quando apresentam sinais de mastite. Os genes para a TSST-1 e a enterotoxina estafilocócica são associados com casos mais severos da doença ou casos que não respondem ao tratamento com antibióticos (LAPPIN; FERGUSON, 2009; DEVRIES et al., 2011).

O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *Staphylococcus* de origem animal foi feito por Jones e Wieneke (1986). No Brasil, as primeiras pesquisas com esse tema e abordagem foram realizadas por Cardoso et al. (2000), 127 amostras de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite proveniente de vacas com mastite no estado de Minas Gerais, entre 1994 e 1997. Das 127 amostras testadas, 47% eram produtoras de TSST-1. Essa porcentagem foi maior que a encontrada por Nader Filho et al. (2007), que isolaram cepas a partir de amostras de leite de vacas com mastite no rebanho leiteiro do estado de São Paulo, e concluíram que 37,5% das amostras eram produtoras de TSST-1. Por outro lado, o estudo de Sá et al. (2004) não identificou a ocorrência de cepas produtoras dessa toxina nos casos de mastite estudados na região de Botucatu/SP.

Assim como constatado na pesquisa de Nader Filho et al. (2007), o estudo de Zafalon et al. (2009) também demonstrou a existência dessas bactérias, em

diferentes fontes de transmissão, no contexto da cadeia epidemiológica da mastite bovina. Portanto, autores alertaram acerca dos possíveis impactos na saúde pública. Em ambos os estudos, são sugeridas intervenções, especialmente maior atenção por parte dos órgãos oficiais de inspeção e de vigilância sanitária. Dessa forma, o processo de fabricação do leite e de seus derivados seriam inspecionados e controlados, evitando a contaminação por *Staphylococcus* em humanos (NADER FILHO et al., 2007; ZAFALON et al., 2009).

2.3 PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE

O consumo de leite e de seus derivados como fontes importantes de nutrientes não é uma ocorrência recente, pois, desde a antiguidade o homem reconhece sua importância. Na atualidade o leite é considerado um dos produtos alimentícios mais consumidos do mundo (LEITE et al., 2006). O processo de pasteurização, descoberto por Louis Pasteur (1863) tornou o leite e seus derivados mais seguros para o consumo humano, destruindo as bactérias que podem prejudicar a saúde. O processo de pasteurização lenta consiste na eliminação de bactérias patogênicas pelo aquecimento do leite a uma temperatura entre 50 a 60°C por alguns minutos, seguido por um brusco resfriamento (GOFF 2007).

Segundo Bezerra et al. (2010), o leite caracteriza-se como uma mistura de substâncias, tais como: glicídios, proteínas, lipídios, água, dentre outras. Ele pode ser consumido na forma *in natura* ou pode, através de decomposições, gerar outros produtos alimentares, como manteiga, doces, queijos etc. Dentre os principais produtos derivados do leite, tem-se o queijo, o qual apresenta altos índices de comercialização entre os brasileiros, sobretudo aqueles produzidos de forma artesanal.

Uma característica importante é a regionalização da produção e do consumo. Na Europa 60% do leite produzido é consumido no país de origem. No Brasil, existem regiões que concentram grande número de produtores de leite e também muitos laticínios ou grandes indústrias que captam o leite produzido na região onde se instalam, formando as chamadas bacias leiteiras. O leite e seus derivados, dispostos

à venda, são em sua maioria produzidos e industrializados na mesma região (ASSIS et al., 2016).

Segundo Vilela et al. (2016), o elevado consumo do leite e seus derivados, sobretudo o queijo artesanal, no Brasil, reforça a necessidade em se estabelecer normas de controle na sua produção, o objetivo é a adoção de boas práticas entre os produtores, visando atender os padrões mínimos de segurança e qualidade do que é oferecido à sociedade.

Embora tenha destaque entre os consumidores, contribuindo para a economia brasileira, além de representar a herança cultural de muitas regiões brasileiras, é preciso considerar alguns desafios que permeiam, sobretudo o processo de produção dos queijos artesanais. Esses derivados do leite são alimentos muito manipulados e, por esse motivo, existe um grande risco de contaminação, principalmente por bactérias. Existe um agravante relacionado à utilização do leite cru, principalmente quando não há emprego de boas práticas de higiene ou não são maturados por período suficiente (SOARES et al., 2018).

Os queijos artesanais representam a história de um povo, o que demonstra para as gerações futuras, técnicas de fabricação e costumes familiares, muitos desses vindos de outras partes do mundo. Logo, esses produtos, além da contribuição econômica, visto que geram renda e emprego, também fortalecem a prática da agricultura familiar. No Brasil, o Estado de Minas Gerais destaca-se na produção de queijos artesanais, cuja atividade vai muito além do aspecto econômico, sendo o Queijo Minas Artesanal considerado como importante elemento do patrimônio cultural brasileiro (MENEZES, 2006).

2.3.1 Queijo Minas Artesanal

O Queijo Minas Artesanal, segundo o Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (MINAS GERAIS, 2008), é aquele elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru integral, utilizando-se como ingredientes o “pingo”, coalho e sal e, no ato da prensagem, apenas o processo manual. “Pingo” é o termo utilizado para

uma fração de soro fermentado, originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior, que é coletado e utilizado como fermento. A composição do soro fermento é característica de cada região produtora e contém culturas lácticas selecionadas (RESENDE et al., 2011). Sua produção se caracteriza pela utilização de leite cru recém-ordenhado em pequenas propriedades rurais com base em agricultura familiar e submetidos à maturação. De extrema importância econômica para o estado, o QMA gera renda para os pequenos produtores rurais (DORES; FERREIRA, 2012).

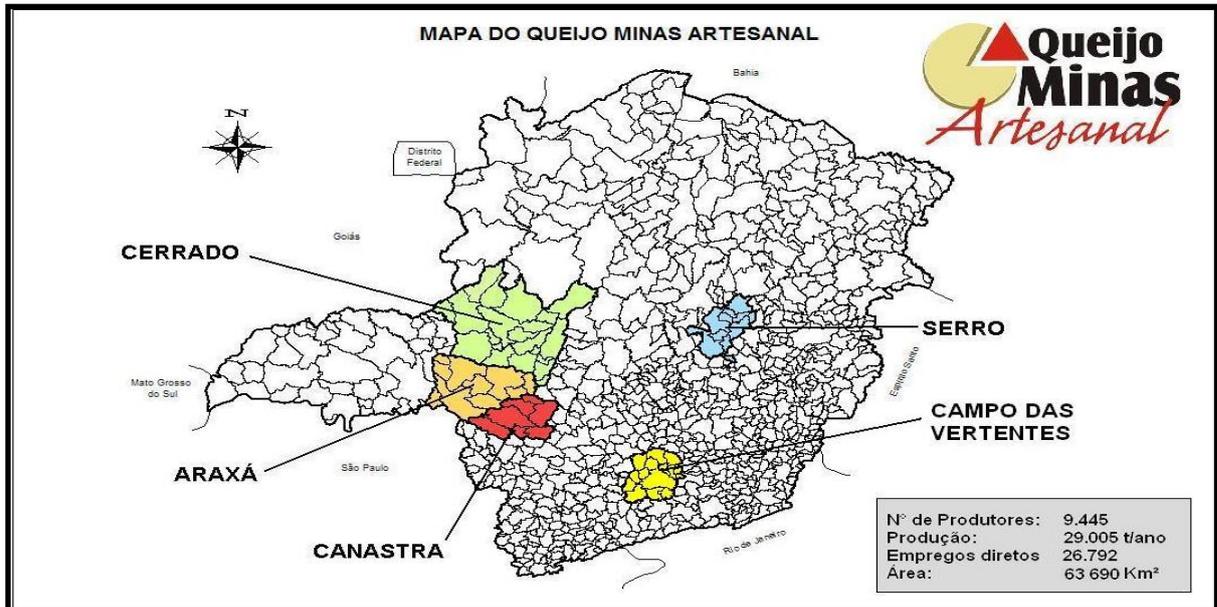
O crescimento da fabricação de queijos em diversas regiões de Minas Gerais, atrelado ao sucesso alcançado com a comercialização, viabilizou a necessidade de registrar essa atividade junto ao Inventário Nacional de Referências Culturais do Instituto do Patrimônio Histórico Artesanal de Minas Gerais como patrimônio imaterial (CHALITA et al., 2009).

É provável que o sucesso dos queijos artesanais e o consequente desenvolvimento da região mineira especializada nessa atividade estejam ligados, principalmente, às especificidades desse produto. Isso decorre do fato de possuir sabores específicos, o que promove benefícios de mercado, além de preços mais acessíveis a grande parcela da população (CORREIA; ASSIS, 2017). No caso específico do QMA, salienta-se que outros fatores contribuem para sua aceitação no mercado, tais como: o clima da região, a altitude, pastagem nativa para os rebanhos, dentre outros (SOBRAL et al., 2017).

Segundo dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER–MG), essa atividade mantém na Agricultura Familiar cerca de 30 mil famílias de pequenos produtores espalhados em cerca de dois terços dos 853 municípios mineiros, sendo cerca de 9.500 famílias, somente nas regiões tradicionais. Essa distribuição territorial disforme tornou-se uma das justificativas para que a produção de queijos seja incentivada (MERGAREJO NETTO, 2011).

Dentre as diversas regiões propícias para a criação de gados, como também, o fortalecimento da Agricultura Familiar, destacam-se, no Estado de Minas Gerais, cinco principais microrregiões. Elas são a Região da Serra do Canastra, do Serro, do Alto das Vertentes, Cerrado e também de Araxá, como indicado na figura 1.

Figura 3 - Regiões tradicionalmente produtoras do Queijo Minas Artesanal

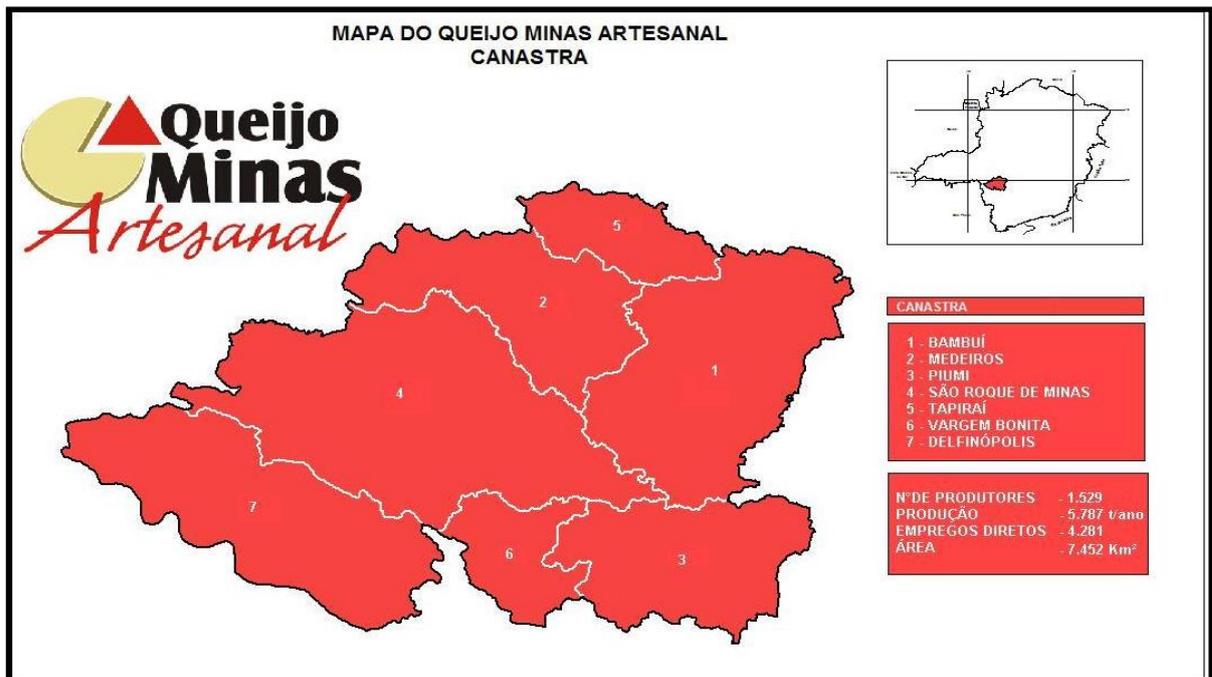


Fonte: EMATER-MG (2013).

A Serra do Canastra está situada na região sudoeste do estado mineiro, possuindo uma extensão territorial de 7.452 km² e é composta por sete grandes municípios que se destacam na produção de queijo artesanal. Eles são Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita (RESENDE, 2010).

Segundo dados da EMATER-MG (2013), essa microrregião possui 1529 produtores de queijo, com uma produção equivalente a 5.787 toneladas por ano, o que gera, aproximadamente, 4.281 empregos diretos. Dessa forma a atividade contribui para o crescimento econômico de Minas Gerais. A figura 2 expõe o mapa geográfico da Serra do Canastra, com destaque à divisão dos municípios.

Figura 4 – Divisão territorial da Serra do Canastra

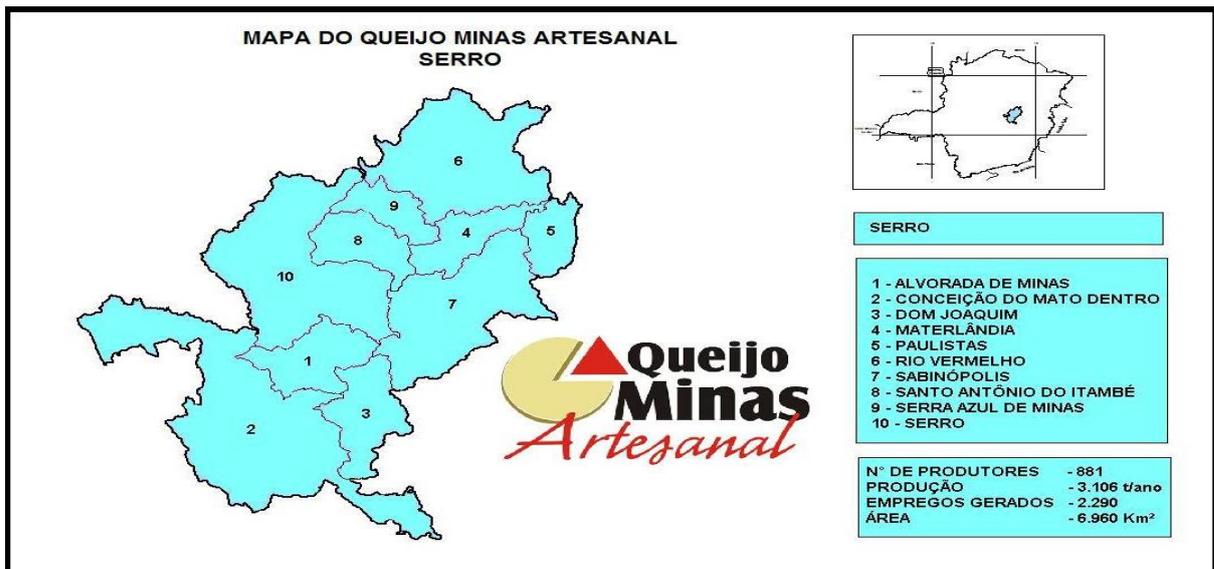


Fonte: EMATER-MG (2013).

Pela caracterização geográfica, com clima chuvoso e por ser uma região com abundância de água, favoreceu-se a formação de grandes campos apropriados para a criação de gado (RESENDE, 2010). O queijo artesanal produzido nesse local possui, um significado econômico expressivo, sendo que em alguns municípios estudados, representa a principal fonte de renda e empregos, para os agricultores e familiares. Os aspectos sociais e econômicos comuns aos produtores de queijo são desde séculos atrás, elementos marcantes do dia a dia dos seus habitantes (ALMEIDA et al., 2012).

Outra região de destaque na produção do QMA é a do Serro, formada pelos municípios de Conceição do Mato Dentro, Alvorada de Minas, Dom Joaquim, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Rio Vermelho, Materlândia, Paulistas e Serro. Em conjunto, esses municípios contemplam 881 produtores, com uma produção de 3.106 toneladas por ano, gerando 22.290 empregos (EMATER-MG, 2013). A Região do Serro possui uma extensão territorial de 6.960 km², e, geograficamente, está situado no Vale do Jequitinhonha, no estado de Minas Gerais (figura 3).

Figura 5 – Mapa da Região do Serro, com divisão territorial dos municípios



Fonte: EMATER-MG (2013).

Assim como os queijos produzidos na Serra da Canastra, os queijos da Região do Serro são a base econômica da região, que tem como principal atividade a exploração da pecuária de leite. O Serro e municípios vizinhos produzem diariamente em torno de 80.000 litros de leite. Desses, aproximadamente 15.000 litros são destinados à indústria de transformação de leite mantida pela Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro LTDA. Outros 45.000 litros são destinados a demais compradores de leite; e cerca de 60.000 litros são transformados em queijos artesanais a partir do leite *in natura* EMATER-MG (2013).

Esses produtos representam a principal fonte de sustento de quase 1.000 pecuaristas da região. Em sua larga maioria, 76 %, são produtores de economia familiar, que não tem outra atividade alternativa. Sem a produção do queijo artesanal, teriam de viver a custos de subsídios públicos, ou migrar para as grandes cidades, o que, em ambos os casos, trariam transtornos sociais (ABREU, 2000).

Além da Serra da Canastra e Serro, Alto das Vertentes é outra região que produz o QMA, sendo formada por 14 municípios. Eles são: Barroso, Conceição da Barra de Minas, Coronel Xavier Chaves, Carrancas, Lagoa Dourada, Madre de Deus de Minas, Nazareno, Prados, Piedade do Rio Grande, Resende Costa, Ritópolis, Santa Cruz de Minas, São João Del-Rei, São Tiago e Tiradentes. Esses municípios

ocupam uma área de 6.254 km² (figura 4), com clima predominantemente chuvoso, o que influencia na cultura leiteira (MORENO, 2013).

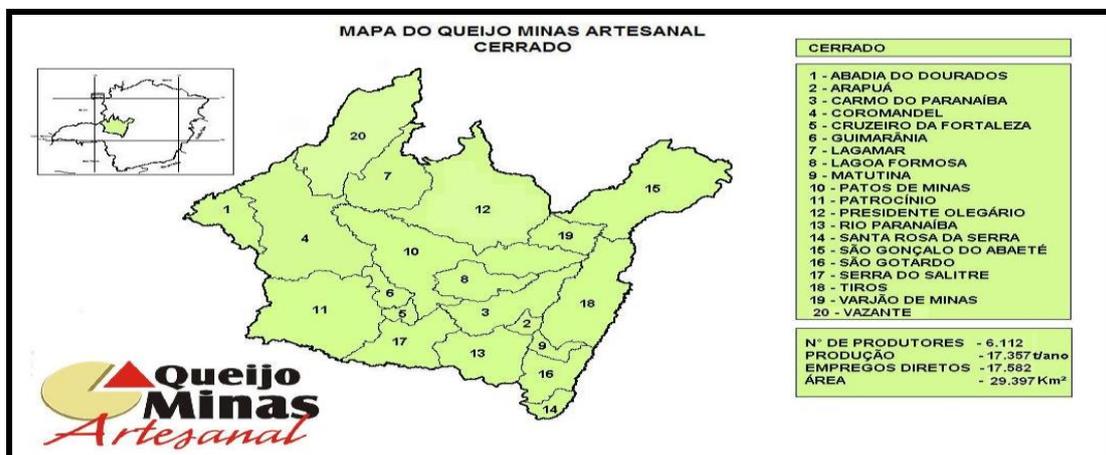
Figura 6 – Apresentação cartográfica da Região Alto das Vertentes



Fonte: EMATER-MG (2013).

Semelhante às regiões citadas, Cerrado também é outro território com forte influência na produção de queijo artesanal. Situada no oeste de Minas Gerais, a região possui uma extensão territorial de 29.397 km², em que congregam vinte pequenas cidades. Nesses municípios, há registros da existência de 6.112 produtores formais, os quais produzem um total de 17.357 toneladas por ano de queijo, gerando 17.572 empregos, conforme dados fornecidos pela EMATER-MG (2013). Essas informações são apresentadas na figura 5.

Figura 7 – Municípios que compõem a região de Cerrado

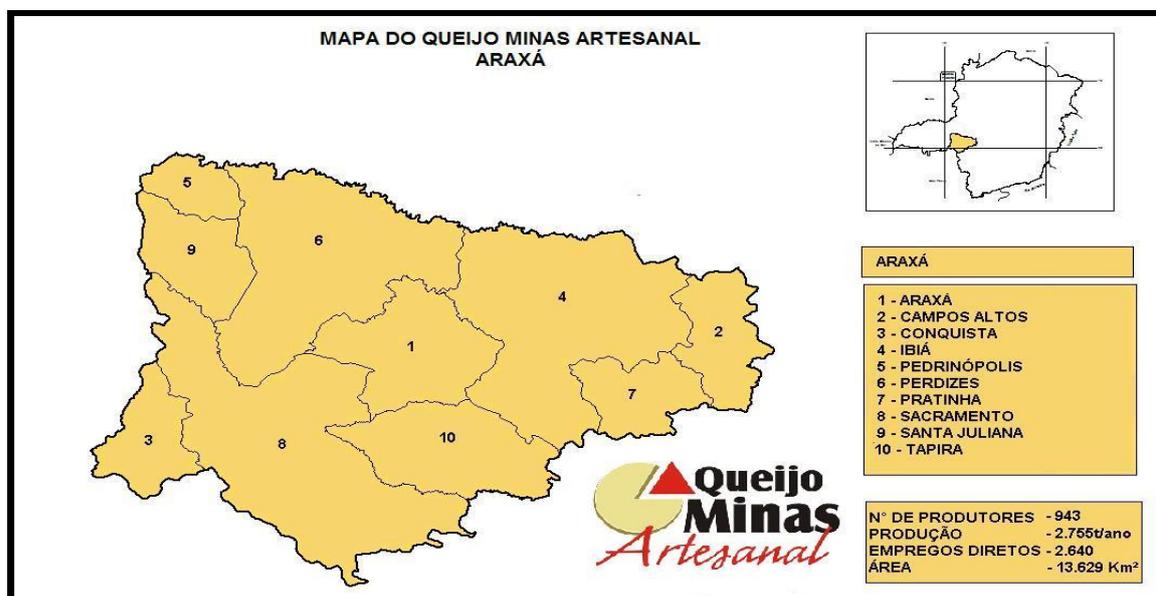


Fonte: EMATER-MG (2013).

De acordo com Oliveira et al. (2017), a região do Cerrado destaca-se como um importante polo industrial quanto à produção de queijo artesanal. Devido a diferentes fatores, como as condições ambientais que se apresentam como apropriadas para a criação de gado, como também o clima e relevo que proporcionam o desenvolvimento de bactérias típicas da região.

Por fim, segundo a EMATER-MG (2013), outra região influente na produção de queijo artesanal é Araxá, cuja extensão territorial é de 13.629 km². A região é composta por dez cidades, as quais, em conjunto produzem um total de 2.755 toneladas de queijo ao ano. Além disso, Araxá gera 2.640 empregos diretos e estão presentes na região 943 produtores (figura 6).

Figura 8 – Municípios que compõem a Região do Araxá



Fonte: EMATER-MG (2013).

O queijo dessa região é destacado, em virtude de possuir, assim como as demais regiões, forte influência cultural. Com origens voltadas ao século XVIII, cuja técnica de fabricação permaneceu mantida ao longo dos tempos, trata-se de um queijo de

grande importância histórica e cultural para o Estado de Minas Gerais (ARAÚJO, 2004).

2.3.2 Legislação do Queijo Minas Artesanal

A produção do Queijo Minas Artesanal é centenária. No entanto, foi somente no ano de 2002, que instituiu a Lei nº 14.185, de 31 de janeiro, a qual dispôs sobre o processo de sua produção. Essa lei indica o QMA produzido conforme tradição histórica e cultural da região estadual, em que é produzido. Essa lei definiu normas de fabricação, de embalagem e de transporte do queijo artesanal. Estabeleceu ainda a obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias junto ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (MINAS GERAIS, 2002a), sendo regulamentada pelo Decreto nº 42.645, de 5 de junho (MINAS GERAIS, 2002b).

Segundo o Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), o IMA certificará as condições higiênico-sanitárias necessárias para produção do queijo artesanal. Os principais fatores serão a higiene dos manipuladores, os processos de obtenção do leite e de elaboração do queijo, o armazenamento e o transporte do queijo para comercialização, bem como a sanidade do rebanho.

A primeira década do século XXI (2000 a 2010) foi um período de extrema importância para o Queijo Minas Artesanal, em que ocorreram movimentos para o reconhecimento de seu valor histórico em Minas Gerais. Assim, a edição da Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 e regulamentada pelo Decreto Estadual nº 42.645, de 05 de junho de 2002, foi de real valor e significado para a produção queijeira artesanal nesse estado. Dentre as diversas razões que podem justificar essa importância, considera-se, principalmente, a identificação, caracterização da região e sua tradição histórica e cultural na atividade.

No mesmo ano, a Portaria nº 517, de 14 de junho, do IMA, estabeleceu normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção do queijo artesanal, sendo obrigatória a vacinação contra febre aftosa, raiva e brucelose, além do controle de mastite e parasitas no rebanho. No caso das vacinas, o produtor deve

realizar os testes anualmente e apresentar a comprovação no IMA (MINAS GERAIS, 2002c).

Além da portaria mencionada, a Portaria n° 518, 14 de junho de 2002 também estabelece algumas exigências aos produtores, o que reforça ainda mais o processo de controle, fiscalização e segurança dos queijos produzidos. Assim, o documento dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação de Queijo Minas Artesanal, descrevendo desde o curral e sala de ordenha até os equipamentos utilizados na produção (MINAS GERAIS, 2002d). Complementar a esse documento, em 3 de julho de 2002, entrou em vigor a Portaria n° 523, a qual aborda as condições higiênico-sanitárias e boas práticas de manipulação e fabricação do Queijo Minas Artesanal (MINAS GERAIS, 2002e).

Além dessas conquistas, a Portaria n° 818, de 12 de dezembro de 2006, aprovou o regulamento técnico para a produção do Queijo Minas Artesanal, no que tange à auditoria de conformidade. Essa Portaria contemplou normas para o funcionamento dos centros de distribuição, procedimentos para coleta de amostras, parâmetros para avaliação de risco, documentos necessários para cadastro junto ao programa Queijo Minas Artesanal da EMATER-MG, além das regras para rotulagem do produto (MINAS GERAIS, 2006).

Além das legislações descritas, algumas alterações foram realizadas, com objetivo de melhorar continuamente o processo de produção de queijos, gerando, como consequência, benefícios para produtores e consumidores. O Decreto n° 44.864, de 1º de agosto de 2008, por exemplo, alterou o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispunha sobre o processo de produção de queijo artesanal, delimitando a área e situações para a produção, a qualidade do produto e da água utilizada, bem como embalagem, transporte e comercialização desse queijo (MINAS GERAIS, 2008).

Em 2011, a Lei n° 19.492, de 13 de janeiro, alterou vários pontos da produção do Queijo Minas Artesanal citados na Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dentre as modificações, é importante enfatizar o processo de fabricação do queijo, o

processo de rotulagem demarcando da região conforme regulamento, dentre outros aspectos cadastrais (MINAS GERAIS, 2011).

No mesmo ano, em âmbito federal, foi criada a Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro, a qual permitiu que os queijos artesanais sejam maturados por período inferior a sessenta dias. Essa autorização somente será válida desde que haja estudos que comprovem que os requisitos mínimos microbiológicos fossem atendidos como valores de umidade e contagens microbiológicas dentro dos limites permitidos (BRASIL, 2011).

Outra Lei que dispõe sobre os queijos artesanais é a Lei Estadual nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012, que menciona aspectos relacionados à produção e à comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Seu intuito foi gerar regras que viabilizem a expansão da produção e ainda dispor sobre a condição higiênico-sanitária dos estabelecimentos de produção (MINAS GERAIS, 2012).

Em síntese, observa-se que a legislação cumpre o papel controlador dessa atividade, ao estabelecer critérios sobre o cadastramento dos produtores e conseqüentemente sua adaptação aos novos parâmetros para as boas práticas da agricultura. Além de organização social, envolve ainda um grande esforço em realizar as caracterizações dos queijos, segundo suas regiões de origem e propriedades organolépticas (MERGAREJO NETTO 2012).

Além da legislação referente aos aspectos estruturais das queijarias e a devida certificação desses estabelecimentos, é preciso considerar, também, as exigências estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Essa agência, por meio da Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001, estabeleceu regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (ANVISA, 2001).

O objetivo principal desse documento é instituir uma referência sanitária para a fiscalização de estabelecimentos que comercializam alimentos industrializados e/ou *in-natura*, assim como restaurantes, açougues, supermercados, feiras livres e outros. Com isso, a resolução determina os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, descrevendo os microrganismos que representam riscos à saúde do

consumidor, tais como os estafilococos coagulase positiva, salmonela, bacilos cereus e listeria monocitogenes (KOGA; FAGNANI, 2014). São também descritos os grupos alimentares e a tolerância exigida para cada tipo de microrganismo. No caso dos queijos, a tolerância para amostra indicativa deve ser de 10^3 por grama dos microrganismos permitidos (ANVISA, 2001).

Assim, para atender a legalização, desenvolver estudos acerca do processo de fabricação, com base no atendimento aos parâmetros legais, e condições adequadas de higiene e produção oferecidas pelas queijarias, torna-se um fator indispensável, garantindo melhorias no processo produtivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e metodologias de análise das amostras de Queijo Minas Artesanal

As amostras de Queijo Minas Artesanal foram provenientes do projeto “Fatores de risco para patógenos específicos em queijos artesanais e avaliação do tempo de maturação adequado para assegurar a inocuidade deste alimento” coordenado por Dr. Marcio R. Silva e Financiado pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (SEG 02.13.10.007.00.00) e FAPEMIG termo_APQ-03989-17.

Foram coletadas 25 amostras de Queijo Minas Artesanal das propriedades localizadas nas microrregiões tradicionalmente produtoras de queijo no período de 2017 e 2018, e enviadas para o Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) onde foram analisadas quanto ao parâmetro Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os isolados foram encaminhados para o Laboratório de Enterotoxinas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) para a verificação da capacidade de produção de TSST-1.

A metodologia de análise adotada para o parâmetro Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi a descrita no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (2015), e a produção de TSST-1 foi verificado pela Técnica de Sensibilidade Ótima em Placas – OSP (APHA, 2001).

3.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foram pesados 25 gramas da amostra em bolsas plásticas estéreis e, em seguida, adicionados 225ml de solução salina- peptonada (diluição 10^{-1}). Posteriormente foram realizadas demais diluições (10^{-2} e 10^{-3}). Um volume de 0,1 mL das diluições preparadas foi inoculado na superfície de placas contendo Ágar Baird-Parker (meio diferencial seletivo para o isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*) e o inóculo espalhado uniformemente na superfície do meio, com auxílio de alça de Drigalski, até a completa absorção. Em seguida, incubadas a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação foram selecionadas para contagem, as placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias suspeitas de *Staphylococcus* spp. Foram consideradas como colônias típicas aquelas que apresentaram coloração negra, brilhante, forma arredondada, convexa, com bordas regulares, circundadas por um halo branco (lipase) e outro externo maior transparente (lecitinase).

Colônias típicas e atípicas (n=5) foram repicadas, individualmente, para tubos de hemólise contendo Caldo BHI. Os tubos foram incubados a 37°C por 18-24 horas. Após o período de incubação as culturas foram submetidas ao teste coagulase. O número de células (UFC/g) de *Staphylococcus* coagulase positiva foi obtido por regra de 3 simples e o resultado multiplicado pelo fator de diluição.

As linhagens coagulase positiva foram testadas para as seguintes provas: DNase, Manitol, maltose, Hemólise em Agar Sangue e agrupadas (pool) de acordo com o perfil bioquímico encontrado.

A qualidade microbiológica das amostras analisadas foi baseada nos parâmetros estabelecidos pela Legislação Vigente (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC12/2001 MS) que estabelece uma tolerância máxima para *Staphylococcus* coagulase positiva de 10^3 UFC/g.

3.3 Verificação da produção de TSST-1 dos isolados

Placas de Petri contendo 20mL de ágar Infusão de cérebro e coração (BHI ágar) acrescido de 1% de extrato de levedura e 0,1 % de fosfato de potássio, foram recobertas com um disco de membrana de diálise Sepectra 6000-8000-100 mm, esterilizadas de igual diâmetro.

Após a acomodação da membrana sobre o ágar, com auxílio de alça de Drigalski, foi espalhado sobre a mesma, 0,5 mL do pool das culturas obtidas acima. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O cultivo assim obtido foi lavado com 2,5mL do tampão PBS (NaHPO₄) - 0,2M- pH 7.5). O lavado da cultura foi transferido para tudo da centrífuga e centrifugada sob refrigeração a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um frasco e ao mesmo, adicionado 20uL de timerosol 1:1000 como conservante.

Posteriormente, foram preparadas placas de Petri de 50x12 cm, com 3mL de ágar noble preparado em tampão PBS 0,02M pH 7,4, acrescido de 0,1 mL de timerosol 1:1000. Após a solidificação do meio, foram feitos 5 orifícios de 8,3 mm e 2 outros medindo 6,7mm. Nos dois orifícios menores foi adicionado toxina padrão e no orifício central, a anti-toxina correspondente de título conhecido, de forma que as linhas de precipitina formadas pela reação antígeno/ anticorpo, se situem na metade das distâncias entre estes e cada um dos orifícios menores.

Os orifícios restantes foram preenchidos com sobrenadante das amostras teste nas diluições (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8). A placa foi incubada em câmara úmida por 24 horas a 37°C. A leitura foi realizada e, consideradas como reação positiva quando evidenciada a presença de linhas de precipitina formadas entre o sobrenadante da cultura teste e antissoro controle. O resultado para as amostras positivas foi expresso como presença de *Staphylococcus* spp produtor de TSST-1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período proposto foi avaliada a qualidade microbiológica (*Staphylococcus* coagulase positiva) de amostras de QMA de 25 pequenos produtores localizados nas regiões do Serro, Cerrado e Canastra abrangendo os municípios do Serro, Materlândia, Sabinópolis, Alvorada de Minas, Carmo do Paraíba, Rio Vermelho, Paulistas e Medeiros.

Para que seja possível a sua comercialização em todo o país, o queijo deve atender os padrões exigidos pela legislação federal (Brasil, 2000) que estipula um tempo mínimo de maturação de 60 dias para aqueles produzidos com leite cru. Este período de maturação, em princípio, garante a sua qualidade uma vez que pode contribuir significativamente para a eliminação de agentes patogênicos. O não cumprimento da legislação restringe a sua comercialização, na informalidade e apenas em seu estado de origem.

As amostras coletadas apresentaram um período de cura entre 5 e 39 dias com uma média de 22 dias (Tabela 01). Tempo de cura inferior ao estabelecido pela legislação vigente pode proporcionar o desenvolvimento de contaminantes patogênicos como: *Staphylococcus* enterotoxigênicos o que representa um risco para saúde dos consumidores (Aarestrup *et al.*, 1995; Le Loir *et al.*, 2003). Observa-se também que a maioria dos produtores que participaram deste estudo estão localizados na microrregião do Serro (Figura 3).

Tabela 1: Tempo e temperatura de maturação de queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra no período de 2017 e 2018.

Tempo de Maturação (Dias) Média= 22	N°	N° de amostras maturadas à temperatura de refrigeração (3-9°C).	
		N°	%
05-10	16	15	60
11-20	4	2	8
21-30	2	0	0
31-39	3	0	0
Total	25	17	68

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

A curva de crescimento de microrganismos é influenciada pela temperatura e, observa-se que 17 dos pequenos produtores maturavam os queijos entre 3 e 9°C. De acordo com Dores (2013) a refrigeração inibe o crescimento de bactérias desejáveis no processo de maturação favorecendo a manutenção de microrganismos patogênicos, quando presentes no leite cru.

Neste estudo observamos que a maioria dos queijos mantidos sob refrigeração apresentaram contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva superior ao estabelecido pela legislação, como detalhado na tabela 2. Tais resultados estão de acordo com Borelle et al (2011) que, em seus estudos sobre *Staphylococcus* spp isolados de queijo Minas observaram que as amostras com menos de 7 dias de maturação apresentaram contagem acima de 10^3 UFC/g e aqueles com 7 e 15 dias apresentaram contagem de *S. aureus* acima de 10^5 UFC/g.

Na tabela 2 encontram-se o perfil de reprovação das amostras de Queijo Minas Artesanal produzidas nas microrregiões avaliadas, para o parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva (RDC12-2001 MS) e a incidência de linhagens produtoras de Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico.

Tabela 2: Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra no período de 2017 e 2018.

Contagem (UFC/g)	Nº	%	Interpretação	Presença de TSST-1
Até $1,0 \times 10^3$	4	16	A*	0
$2,0 \times 10^3 - 9,0 \times 10^4$	12	48	R**	0
$>1,0 \times 10^5$	9	36	R**	0
Total	25	100		0

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

*A: Aprovada

**R: Reprovada

Critérios de Aprovação/Reprovação: RDC nº12 de 2001 MS - valor de referência: $1,0 \times 10^3$ (UFC/g)

A análise dos resultados revelou que, das 25 amostras de queijo produzidas por 25 pequenos produtores avaliados apenas 16% atendem a legislação vigente. Já 36% das amostras apresentaram um nível de contaminação com contagem acima de (contagem $>1,0 \times 10^5$ UFC/g), que as tornam potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

Em nenhuma das amostras avaliadas neste trabalho foi detectada linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva produtoras de TSST-1. Já Cardoso et al (2000) ao avaliarem 127 linhagens de *S. aureus* isoladas de amostras de leite proveniente de vacas com mastite no Estado de Minas Gerais, verificaram que 47% eram produtoras de TSST-1. Provavelmente a presença de linhagens produtoras de TSST-1 no trabalho de Cardoso esteja relacionada à mastite apresentada pelos animais. Embora as amostras de queijo analisadas neste trabalho tenham apresentado elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva é sabido que a expressão dos genes produtores de toxina é modulada por fatores ambientais como pH e microbiota presente no queijo (LE LOIR, 2003).

Na tabela 3 encontra-se apresentado os resultados da avaliação da qualidade microbiológica das amostras de queijo Minas Artesanal produzidas nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra assim como o potencial de produção da

Toxina 1 da síndrome do Choque Tóxico das linhagens de *Staphylococcus* coagulase positivo isoladas.

Tabela 3: Qualidade microbiológica dos queijos Minas Artesanal, fabricados por pequenos produtores localizados em diferentes microrregiões de Minas Gerais no período de 2017 e 2018.

Cidades	N° Produtores	Microrregiões	N° de Amostras com contagem > 10 ³ UFC/g		N° de Amostras com contagem > 10 ⁵ UFC/g	
			N	%	N	%
Serro	13	Serro	12	48	4	16
Materlândia	1	Serro	1	4	1	4
Sabinópolis	2	Serro	2	8	2	8
Alvorada de Minas	3	Serro	3	12	2	8
Carmo da Paraíba	1	Cerrado	0	0	0	0
Rio Vermelho	1	Serro	0	0	0	0
Paulistas	1	Serro	1	4	0	0
Medeiros	3	Canastra	2	8	0	0
TOTAL	25	3	21	84	9	36

Fonte: Dados da pesquisa (2018). *Observação: Qualidade microbiológica baseada na RDC nº12 2001 MS, para o parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva.

O Serro foi a microrregião onde se concentra a maioria dos municípios dos pequenos produtores de Queijo Minas Artesanal avaliado neste estudo. Observa-se que quase a metade dos municípios produzem queijos que não atendem à legislação quanto ao parâmetro analisado e 16% produzem queijos potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar (Tabela 3).

5 CONCLUSÃO

O município do Serro representa a localidade com o maior número de produtores de Queijo Minas Artesanal avaliado neste estudo. Isto se deve ao fato das amostras terem sido coletadas, na maioria das microrregiões do município.

A maioria dos pequenos produtores de Queijo Minas Artesanal produzem queijos que não atendem a legislação vigente quanto ao parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva, trazendo riscos à saúde da população local, e das regiões onde são comercializados estes queijos.

Apesar das amostras de queijo analisadas tenham apresentado elevado índice de reprovação pela contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite estabelecido pela legislação (10^3) tornando o produto impróprio para o consumo. Quando realizada a verificação da produção de TSST-1, constatou-se que as cepas não eram produtoras da toxina. Desta forma, caracteriza o queijo analisado neste trabalho, como um produto com baixo risco de propagação de linhagens produtoras de TSST-1 entre a população que o consome

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. et al. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Can J Vet Res**, Ottawa, v.59, p.124-128, 1995.

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução-RDC n. 12**, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 19 nov. 2018.

ALMEIDA, A. C. et al. Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinária Brasília**, v. 6, p. 312-320, 2012.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALVAREZ, P. A.; MIMICA, M. J. Síndrome do choque tóxico. **Arquivos Médicos do Hospital Santa Casa**, São Paulo, v. 57, n. 2, p. 81–84, 2012.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá**. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Biologia, Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2004. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9041>>. Acesso em: 18 nov. 2018.

APHA - **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**.39.71- Examining *Staphylococcal* Isolates for Enterotoxin Production. 4nd ed. Washington, D.C, 2001

BAIRD-PARKER, A.C. *The staphylococci “an introduction”*. **Journal of Applied Bacteriology**, p.1-8, 1990.

BEZERRA, J. R. M. V. ET AL. **Introdução à tecnologia de leite e derivados**. Guarapuava: UNICENTRO, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº57, de 15 de dezembro de 2011. Considera a necessidade de estabelecer critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.52, p.7-10, 2000.

CERCA N. et al. Molecular basis for preferential protective efficacy of antibodies directed to the poorly acetylated form of staphylococcal poly-*n*-acetyl. **Infectologia Immunológica**, v. 75, n. 7, p. 3406-3413, 2007.

CHALITA, M. A. N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 6, jun. 2009. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/IE/2009/tec8-0609.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

COELHO, S. M. O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 369-374, 2009.

CORREIA, V. T. V.; ASSIS, I. C. L. Queijos artesanais: revisão de literatura. **Nutritime: Revista Eletrônica**, Viçosa, v. 14, n. 6, p. 8001-8008, nov/dez. 2017.

Deleo FR, Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009; 119 (9): 2464-74. **Microbiology**, [S.l.], v. 127, n. 3, p. 246-251, 2008.

DEMEU, F. A. et al. Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n.2, p. 167-174, mar/abr. 2015.

DEVRIES A. S. et al. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. **PLoS One**, v. 6, n. 8, 2011.

DINGES, M. M. et al. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiologia Clínica Revisada**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, p. 26-34, dez. 2012.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Mapa do queijo**. 2013. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59>. Acesso em: 17 nov. 2018.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Genus *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2012.

Euzéby, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature** – Genus *Staphylococcus* [Internet]. Acesso em: 17 mar 2019. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, jul/ago. 2004.

FERREIRA, L. M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina.** 2008. 88f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

GAD G. F. M. et al. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **Jornal Infectologia**, v. 3, n. 5, p. 342-351, 2009.

GAMPFER, J. Double mutant and formaldehyde inactivated TSST-1 as vaccine candidates for TSST-1-induced toxic shock syndrome. **Vaccine**, v. 20, n. 1, p. 1354-1364, 2002.

HENNEKINNE, J.A. et al. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, jul. 2012.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais- o estado da arte. Artigo de Revisão, Arquivos de medicina, Porto, Portugal, v. 27, n. 1, p. 27-36, fev. 2013

JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Veterinária Reciclagem**, v. 119, p.435, 1986.

KLOSS, W.E. Systematics and natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, n. 19, p. 25-37, 1990.

KOGA, E. C.; FAGNANI, R. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. In: SANTANA, E. H.; FAGNANI, R. (Org.). **Legislação Brasileira de Leites e Derivados**. Londrina: Unopar, 2014.p. 32-33.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.1465.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infectologic**, v. 9, n. 1, p. 281-90, 2009.

LEITE, Z. T C. et al. Leite e alguns de seus derivados: da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, v. 29, n 4, p. 876-880, 2006.

LOIR, Y. L.; BARON, Florence; GAUTIER, Michel. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LOPES, M. A. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 477-483, out/dez. 2012.

- MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MARQUES, V. F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.
- MENESES, J. N. C. **Queijo Artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil**. Belo Horizonte: Ministério da Agricultura, 2006.
- MERGAREJO NETTO, M. O mercado central de Belo Horizonte: entre queijos e sabores. **Geograficidade**, Belo Horizonte, v.1, n.1, p. 53-67, 2012.
- MINAS GERAIS. **Lei estadual nº 14.185**, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002a.
- MINAS GERAIS. **Decreto nº 42.645**, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002b.
- MINAS GERAIS. **Portaria nº 517**, de 14 de junho de 2002. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção do Queijo Minas Artesanal. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002c.
- MINAS GERAIS. **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. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002d.
- MINAS GERAIS. **Portaria nº 523**, de 03 de julho de 2002. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do Queijo Minas Artesanal. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2002e.
- MINAS GERAIS. **Portaria nº 818**, de 12 de dezembro de 2006. Baixa o regulamento técnico de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.
- MINAS GERAIS. **Decreto nº 44.864**, de **01 de agosto de 2008**. **Altera o regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002**, que dispõe sobre o processo do Queijo Minas Artesanal. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- MINAS GERAIS. **Lei estadual nº 19.492**, de 13 de janeiro de 2011. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

MINAS GERAIS. **Lei nº 20549**, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo. Belo Horizonte, 2012.

MORENO, Victor José. **Caracterização física e físico-química do Queijo Minas Artesanal da microrregião Campo das Vertentes**. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Programa de Mestrado Profissional, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/mestradoleite/files/2013/05/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Final1.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

NADER FILHO, A. et al. produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p.1316-1318, 2007.

OLIVEIRA, A. L. et al. Caracterização do Queijo Minas Artesanal do Cerrado Mineiro da Região do Alto Paranaíba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 6, p. 824-828, 2017. Disponível em: <<https://jcec.ufv.br/index.php/req2/article/view/324>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

PETON, V.; LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infectologia Genética Evolutiva**, v. 21, n. 1, p. 602-615, jan./ago. 2014.

PRADO, R. R. et al. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Maringá, v. 9, n. 8, p. 363-368, ago. 2015.

QUINN P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciência e Farmácia Básica Aplicada**, v. 20, n. 2, p. 9-16, 2009.

RESENDE, M. F. S. **Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra**: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SSLA-87MJQY/dissert__mariadefatimasilvaderesende.pdf?sequence=1>. Acesso em: 19 nov. 2018.

SÁ, D. C. P. **Síndromes de Choques Tóxicos**. 2018. 39f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, 2018.

SÁ, M. E. P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinário**, v. 41, n. 1, p.321-326, 2004.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial strategies for evading or surviving the defense systems of the human body**. Washington: ASM. Press, 2002.

SANTOS, A. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, dez. 2007.

Schlegelová JM, Dendis M, Benedík J, Babák V, Ry ánek D. Staphylococcus aureus isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Vet. Microbiol.** 2003;92(4): 327–34.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. **Mastite Bovina**: Considerações e Impactos Econômicos. 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/953107/1/Doc170.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

SOARES, D. B. et al. Análise sanitária e físico-química e adequação bacteriológica do Queijo Minas Artesanal produzido em duas propriedades. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 3, set. 2018.

SOBRAL, D. et al. Principais defeitos em Queijo Minas Artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 2, p. 108-120, abr./jun. 2017.

SOUZA, K. S. S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Cadernos de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 83-89, 2016.

TODD, J. et al. Toxic-shock syndrome associated with phage group-I staphylococci. **Lancet**, v. 2, n. 1, p. 1116-1118, 1978.

VILELA, D. et al. **Pecuária de leite no Brasil**: cenários e avanços tecnológicos. Brasília: EMBRAPA, 2016.

ZAFALON, L. F. et al. Staphylococcus aureus portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 269-77, 2009.

ZELL, C. et al. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food**.