

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE LINHAGENS
DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA ISOLADAS DE
QUEIJOS MINAS ARTESANAL**

DRIELE SOUZA E SILVA

**BELO HORIZONTE
2019**

DRIELE SOUZA E SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE LINHAGENS
DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA ISOLADAS DE
QUEIJOS 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**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE LINHAGENS
DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA ISOLADAS DE
QUEIJOS MINAS ARTESANAL**

DRIELE SOUZA E SILVA

Belo Horizonte, 19 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Souza Dias
(ORIENTADOR)

Prof. Dra. Soraya Sander Amorim
(MEMBRO)

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo cuidado ao longo desse ano sou imensamente grata pela força, sabedoria e provisão em cada momento, realmente sem ele não teria conseguido, ele foi e será sempre o meu tudo.

A minha família pelo apoio em mais uma etapa da minha vida, em especial meu irmão Lyon Luan que sempre me incentivou e me ajudou quando preciso.

Aos meus amigos que me incentivaram a iniciar o curso, todo apoio no início e ao longo do curso, sou muito grata pela vida de cada um.

Aos meus queridos colegas que ganhei no curso especialização, sou grata pela cumplicidade e parceria ao longo desse ano.

Aos Professores pelos ensinamentos que muito contribui para construção do conhecimento, em especial meu querido Orientador Prof. Dr. Ricardo Souza Dias pelas orientações, por toda paciência e dedicação para comigo, demonstrando sempre presente quando solicitado.

Ao Prof. Dr. Marcio Roberto Silva (EMBRAPA – Juiz de Fora - MG) coordenador do projeto “Fatores de risco para patógenos específicos em queijos artesanais e avaliação do tempo de maturação adequado para assegurar a inocuidade deste alimento”, por ter disponibilizado as amostras para a realização deste estudo.

RESUMO

No Brasil, os queijos artesanais são tradicionalmente fabricados com leite cru levando a possível presença de patógenos e ou suas toxinas responsáveis por distúrbios entéricos que caracterizam os surtos de toxinfecção alimentar. Logo, o tradicional queijo Minas artesanal (QMA) pode representar riscos à saúde humana quando produzidos sem os requisitos necessários de qualidade e adoção de boas práticas de fabricação (BPF). Dentre os possíveis patógenos que podem estar presentes no QMA destacam-se as linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp envolvidas em surtos de DTA no Brasil e no mundo. O microrganismo apresenta a habilidade de se multiplicar no alimento e liberar enterotoxinas responsáveis pelos sinais e sintomas característicos de intoxicação, diarreia e vômito, após um curto período de incubação. A fim de avaliar o potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* isolados de QMA, linhagens coagulase positiva foram selecionadas e testadas para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, pelo método *Optimum Sensitive Plate* (OSP). Para alcançar o objetivo pretendido, amostras QMA de 25 pequenos produtores de 8 municípios das microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra -MG, foram analisadas, sendo o Serro a localidade que representou o maior número de produtores de QMA, neste estudo. A análise dos resultados revelou que, dos 25 pequenos produtores avaliados, 21 produziam QMA que não atendiam à tolerância máxima estabelecida pela Legislação vigente (RDC.12/2001-MS) quanto ao parâmetro Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. Dentre as amostras fora do padrão, nove eram potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar por apresentarem contagem superior a 10^5 UFC/g. Em apenas uma amostra foi isolado *Staphylococcus* coagulase positiva produtora SEA. Embora as linhagens apresentarem um baixo potencial enterotoxigênico para as enterotoxinas testadas, surtos de DTA podem ocorrer pelo consumo do alimento pois podem conter enterotoxinas não testadas neste estudo.

Palavras-chave: Enterotoxina estafilocócica, Intoxicação Alimentar, Queijo Minas Artesanal.

ABSTRACT

In Brazil, Minas artisanal cheese (MAC) are traditionally made from raw milk, which can carry pathogens and / or their toxins responsible for food-borne diseases. Therefore, the traditional MAC can pose risks to human health when produced without both the necessary quality requirements and Good Manufacturing Practices (GMP). Among the possible pathogens present in MAC are the enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* spp., which are responsible for human outbreaks in Brazil and in the world. As enterotoxins are already ready in the food they cause signs and symptoms after a short incubation period. Thus, the enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* coagulase positive isolated from MAC was tested for the SEA, SEB, SEC and SED enterotoxins by the Optimum Sensitive Plate (OSP) method. In order to reach this objective, MAC samples of 25 small producers from 8 municipalities of the Minas Gerais state of Brazil were analysed. Of the 25 small producers, 21 produced MACs that did not meet the maximum coagulase *Staphylococcus* positive counts established by the current legislation (RDC.12-2001 MS). Among the non-standard samples, nine were potentially capable of causing food poisoning because they had a count above 10^5 CFU/g, although isolated strains had a low enterotoxigenic potential for the four enterotoxins tested, with only one isolate producing SEA. It is emphasized, however, that only four types of enterotoxins were analyzed in this study, which does not exempt the isolates from potentially producing other untested enterotoxins.

Keywords: staphylococcal enterotoxin, food poisoning, Minas artisanal cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Regiões Queijeiras de Minas Gerais	20
Figura 2- Regiões Queijeiras e Municípios de Origem	20
Figura 3- Municípios do Serro Produtores de Queijo Minas Artesanal	34

LISTA DE TABELA

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.....	35
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	36
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.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ALMG- ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DE MINAS GERAIS

Arg- ACCESSORY GENE REGULATOR

BPF- BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

DNASE- DESOXIRRIBONUCLEASE

EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

EMATER- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL

EPAMIG- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS

IMA- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA

INCSSN- INTERNATIONAL NOMENCLATURE COMMITTEE FOR
STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN NOMENCLATURE

IPHAN- INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL

Kda - KILODALTON

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, AGROPECUÁRIA E ABASTECIMENTO

OSP- *OPTIMUM SENSITIVE PLATE*

QMA- QUEIJO MINAS ARTESANAL

SAgs- SUPERANTÍGENOS

SEAPA- SECRETARIA DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SE- ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

SEA- ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS A

SEB- ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA B

SEC- ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA C

SED- ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA D

SIM- SERVIÇO DE INSPEÇÃO MUNICIPAL

RDC- RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA

UFC- UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Geral.....	15
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 Queijo Artesanal.....	16
4.1.1 Histórico e características da Produção do queijo Minas artesanal	17
4.1.2 Condições e Período de maturação do Queijo Minas Artesanal	18
4.1.3 Regiões Mineiras Produtoras de Queijo Artesanal.....	19
4.2 <i>Staphylococcus</i> spp	23
4.2.1 Enterotoxinas Estafilocócicas.....	25
4.2.2 <i>Quorum Sensing</i> e produção de enterotoxinas estafilocócicas.....	27
4.2.3 Intoxicação Alimentar por Enterotoxinas Estafilocócicas.....	28
4.2.4 Surtos de intoxicação estafilocócica pelo consumo de queijo	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 Obtenção e metodologias de análise das amostras de Queijo Minas Artesanal	31
5.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	32
5.2 Verificação do potencial enterotoxigênico dos isolados	33
6 RESULTADO E DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O queijo tem estado cada dia mais presente na mesa dos brasileiros e destaca-se pela sua importância histórica e cultural; fabricado em várias regiões o tradicional queijo tem ganhado cada vez mais espaço no mercado consumidor. Com sabor característico e textura diferenciada foi considerado Patrimônio Cultural e Imaterial Brasileiro (IPHAN 2000). Segundo dados divulgados pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em 2017, o Brasil produz um milhão de toneladas de queijo por ano e um quinto desse total é produzido de forma artesanal. Minas Gerais é um dos maiores produtores de queijo artesanal, desempenhando uma importante fonte de renda para agricultura familiar.

O período de maturação adotado pelos produtores pode variar para cada tipo de queijo, segundo MARTINS et al., (2014) a maturação à temperatura ambiente influencia diretamente no comportamento microbiano, causando redução da carga microbiana contaminante. De acordo com LECITRA (2010) os queijos tradicionais originam-se de vários processos que garantem a sua especificidade o que contribui para a formação de características organolépticas únicas, caracterizando-se por fortes ligações ao seu território de origem.

Minas Gerais é um dos maiores produtores de queijo artesanal, o estado é consagrado como importante produtor de QMA as regiões de Araxá, Campos das Vertentes, Cerrado, Canastra, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro constituem regiões que desempenham uma importante fonte de renda para agricultura familiar (NETO, 2009).

Tradicionalmente utiliza-se leite cru recém-ordenhado na produção do queijo artesanal é caracterizado pela adição de pingão (soro salgado fermentado obtido a partir de bactérias lácticas). Condições estas que podem proporcionar a presença de microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas, representando um potencial risco à saúde do consumidor. O presente estudo destaca o *Staphylococcus* coagulase positiva como um importante patógeno pela capacidade de produzir, no alimento, enterotoxinas que, quando consumidas, desencadeiam num curto período de tempo (30 minutos a seis horas) um quadro de gastroenterite caracterizada por diarreia e vômito (EVENSON et al., 1988).

Estudos feitos por ORNELAS et al., (2012) a fim de verificar a presença de enterotoxinas estafilocócicas em amostras de QMA da Serra da Canastra demonstraram que 100% dos queijos analisados apresentaram positivos para as enterotoxinas estafilocócicas (SEB, SEC e SED). De acordo com SENA et al., (2000) a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas presentes em queijos pode desencadear riscos mais sérios do que o consumo da mesma em leite, visto que durante o processo de elaboração desses produtos, as enterotoxinas podem ser concentradas.

Em virtude da grande aceitação do queijo artesanal pela população de várias regiões do país, muitos esforços têm sido feitos para sua normatização com o intuito de contribuir para que esse produto ganhe cada vez mais espaço no mercado formal. Na busca de uma caracterização do cenário atual da qualidade microbiológica do QMA produzido por pequenos produtores de vários municípios mineiros, este estudo teve como objetivo verificar o potencial enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas desse alimento. Esses dados poderão contribuir para uma melhor compreensão sobre os possíveis riscos de ocorrência de intoxicação alimentar relacionada ao seu consumo.

2 JUSTIFICATIVA

Os queijos artesanais têm sua importância tanto econômica como social, no entanto existe uma preocupação quanto à viabilidade do produto. Por ser produzido com leite cru podem conter patógenos e toxinas microbianas causando danos à saúde do consumidor. Estudos realizados por vários autores demonstraram a presença de *S. aureus* em queijos artesanais mineiros em quantidade suficiente para a produção de enterotoxinas (BORELLI et al., 2006; ORNELAS et al., 2012; DORES 2013).

Intoxicações causadas pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas permanecem como potencial risco a saúde pública. Em alguns casos, porém, os sintomas são de curta duração e as pessoas acometidas não procuram serviços médicos. Entretanto, deve ser ressaltado que nos casos em que a intoxicação é agressiva, pode vir a ocorrer óbito dependendo da quantidade de toxina ingerida, do estado físico da pessoa e da assistência médica imediata (ORNELAS et al., 2012).

Considerando as origens do queijo artesanal, seu valor histórico e cultural e como fonte de renda para pequenos produtores, grande atenção tem sido dada para que esse produto tenha reconhecimento nacional. Todavia sua forma de produção, qualidade da matéria prima utilizada e, sobretudo estudos que demonstram que o período de cura mínima não garante um produto seguro, torna-se necessário determinar o risco que o mesmo apresenta à saúde da população devido a possível presença de linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva produtoras de enterotoxinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial enterotoxigênico de linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva presentes em Queijo Minas Artesanal produzidos em diferentes regiões mineiras.

3.2 Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica de Queijos Minas Artesanal quanto á tolerância máxima de *Staphylococcus* Coagulase positiva permitida pela legislação brasileira, RDC 12/2001- Ministério da Saúde.

- Verificar o potencial enterotoxigênico das linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva para as enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC e SED) isoladas das amostras analisadas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Queijo Artesanal

Queijo artesanal é um alimento produzido de forma artesanal com intensa ligação à sua região de origem. DORES (2007) descreve QMA como aquele produzido com leite cru, sendo provavelmente o mais antigo queijo dos brasileiros, a autora descreve que sua produção até hoje faz parte de uma cultura e constitui um patrimônio a ser preservado como testemunho do passado e de uma maneira de viver, para LECITRA (2010) os queijos tradicionais são testemunho da história e da cultura de várias famílias. O Decreto nº 3.551 de 4 de agosto de (2000) consolida o QMA como Patrimônio Cultural e Imaterial do país, traz força à cultura e solidifica raízes de uma geração que muito contribuiu com a história se fazendo viva até hoje (IPHAN, 2000).

As condições para a produção de queijos artesanais com qualidade e inocuidade é estabelecida pela Lei Estadual 20.549 de 2012 da Assembleia Legislativa de Minas Gerais (ALMG). De acordo com a lei o leite para a produção de queijo deve ser proveniente de rebanho sem sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonose, tais como brucelose e tuberculose apresentem resultados negativos.

DORES (2013) estabelece as seguintes fases de produção do QMA: Ordenha, filtração do leite, adição do pingão e do coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, dessoragem, enformagem, prensagem, salga e maturação. As etapas de produção do QMA são semelhantes nas regiões de maior produção, entretanto LECITRA (2010) atribui as características de cada região como clima, pastagem e microbiota do leite cru ao sabor e textura de cada queijo.

4.1.1 Histórico e características da produção do Queijo Minas Artesanal

Segundo PERRY (2004) a possível origem do queijo refere-se a um nômade árabe que em uma de suas viagens pelo deserto teria levado como alimento tâmaras secas e um pouco de leite sendo armazenado em recipiente feito de estômago de animal seco, passado certo tempo, ao beber o leite percebeu que havia se solidificado e apresentado sabor agradável.

Com relação ao tempo, o que se sabe é que havia queijo na Mesopotâmia por 6000 a.C. As escrituras bíblicas citam esse produto no velho testamento no livro de I Samuel e no livro de Jó. Os egípcios estão entre os primeiros povos que manejavam o rebanho como fonte de alimentação tanto o leite quanto o queijo (LEANDRO, 2008).

Na época do Império Romano os queijos alcançaram um alto perfil de aprimoramento, no século XIX iniciou-se a produção em larga escala, porém somente na segunda metade do século XIX ele verdadeiramente avançou, (LEANDRO, 2008).

No Brasil, os relatos datam do período colonial por volta do século XVII, quando os portugueses trouxeram para Minas Gerais vários garimpeiros que produziam o queijo para o consumo próprio, o objetivo era produzir um queijo parecido com o queijo Serra da Estrela, produzido pelos Portugueses (SILVA, 2007).

Em Minas Gerais o queijo artesanal resistiu às alterações da modernização, não só pela tradição o espalhamento das propriedades produtoras também contribuiu para que se conservassem produtos típicos de cada região e de imenso valor cultural e econômico (EMATER- MG 2018).

Para DORES (2007) a fabricação e o consumo de queijo são confundidos com a história e o povoamento da Serra da Canastra, famílias oriundas de São João Del Rei, Barbacena e Sul de Minas, na busca por minerais e pedras preciosas distribuía e comercializavam os queijos entre as pessoas da região. Segundo a autora naquela época o processamento era simples, o coalho era obtido da raspagem do estômago seco de diferentes animais como tatu, porco ou bezerro. Como fermento láctico usava-se o pingo que era trocado entre os pequenos produtores. Os queijos assim produzidos eram transportados em animais de carga, armazenados em malas de couro e, devido às dificuldades de transporte chegava a ser comercializado com 30 a 60 dias de maturação.

4.1.2 Condições e Período de maturação do Queijo Minas Artesanal

As condições para a produção e o período de maturação de queijos artesanais resultam em alterações físicas, químicas e microbiológicas produzidas pela microbiota láctica do queijo, sendo fundamentais para assegurar a qualidade microbiológica do produto (MARTINS et al., 2014).

Uma série de reações metabólicas ocorrem no período de maturação, tais como: glicólise, proteólise e lipólise, que conferem aos queijos sabor, aroma, textura característicos (FOX, 1993). Para FERREIRA (2004) a temperatura (T), potencial redox (Eh), atividade da água (Aw) e potencial Hidrogeniônico (pH) são fatores que afetam o crescimento de microrganismos no queijo durante o período de maturação.

Quanto às condições de maturação adequadas para a comercialização, segundo DORES (2013) os queijos artesanais quando comercializados sem maturação não apresentam qualidade microbiológica segura podendo se tornar um potencial risco para a saúde do consumidor.

De acordo com CARDOSO et al., (2012) o processo de maturação tem efeito sobre os parâmetros microbiológicos do tradicional queijo de Minas, suas pesquisas foram eficazes para detectar indicadores microbiológicos importantes na contaminação do queijo, porém a maturação não foi eficaz na eliminação de enterotoxinas estafilocócicas quando presentes. Seus estudos avaliaram a influência do período de maturação e os parâmetros microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro no período de estação seca e chuvosa. Com relação às enterotoxinas estafilocócicas no período de seca, foram verificadas que duas amostras com 30 dias de maturação e uma amostra com 60 dias continham SEC. Das amostras obtidas da estação chuvosa uma amostra com 30 dias de maturação continha SEB e SEC. A análise dos dados demonstraram que as enterotoxinas permaneceram no queijo, mesmo após 60 dias de maturação, sugerindo que o processo de maturação não foi eficaz na sua eliminação. Todavia faz-se necessário mais pesquisas que avaliem o comportamento microbiano e a produção de enterotoxinas estafilocócicas ao longo do processo de maturação de queijos artesanais.

4.1.3 Regiões mineiras produtoras de Queijo Artesanal

A atividade artesanal garante a renda de muitas famílias que vivem da agricultura familiar. Em muitos municípios elas são beneficiadas pela renda obtida da produção de queijo artesanal (DORES, 2013). Com isso buscam cada vez mais o reconhecimento e a certificação nacional de seus produtos.

Segundo o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) as Microrregiões de maior produção de queijo artesanal são: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro.

Minas Gerais possui várias regiões queijeiras (FIGURA 1), nas quais os queijos artesanais são fabricados basicamente com as mesmas práticas de produção (DORES, 2013). NOBRÉGA et al., (2008) demonstram que queijos da Serra da Canastra fornecem condições de produção que confere características sensoriais próprias. DORES (2013) atribui as características finais de produção do queijo artesanal ao local de origem.

Contudo as queijarias estão espalhadas por todo o Estado (FIGURA 2), sua comercialização tem crescido a cada ano se tornando um produto cada vez mais presente na mesa dos brasileiros, logo, faz-se necessário que as queijarias cumpram às exigências legais garantido um produto seguro de ser comercializado.

Figura 1- Regiões Queijeiras de Minas Gerais

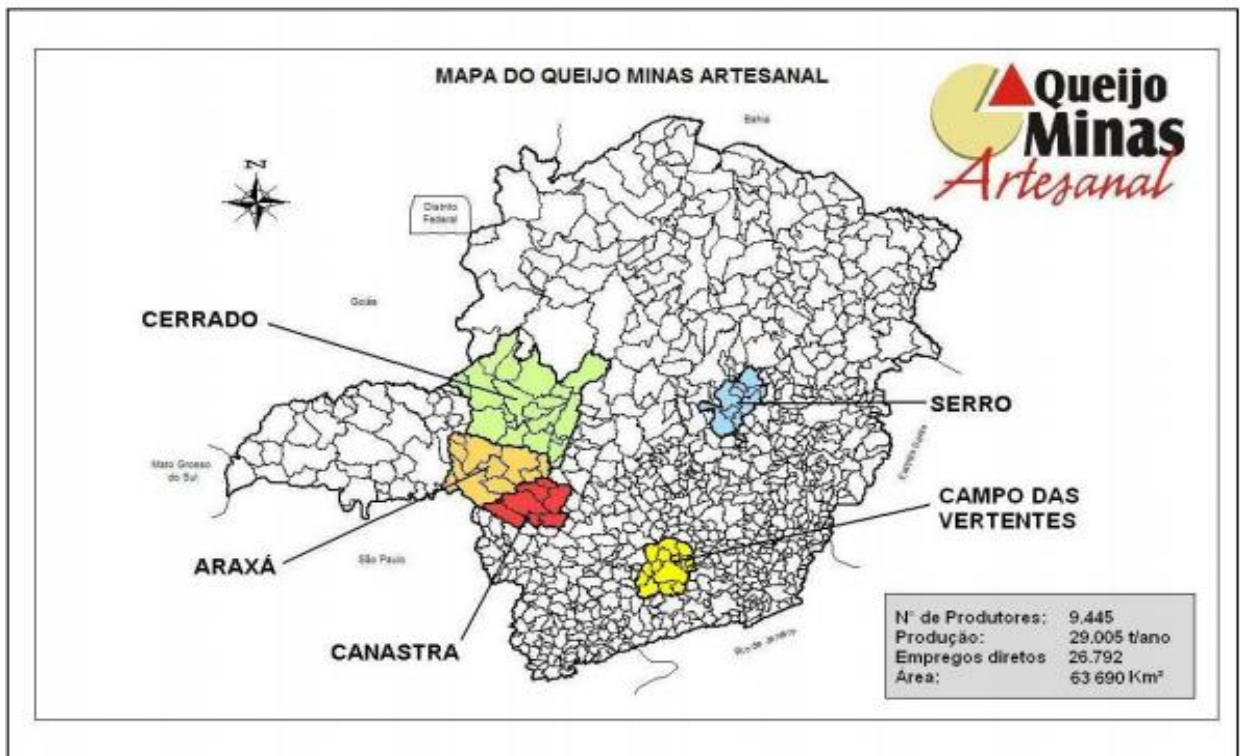


Figura 1: Mapa das Regiões produtoras de Queijo Minas Artesanal. Fonte: EMATER- Empresa de Assistência Técnica e extensão Rural do Estado de Minas Gerais (2018)

Figura 2- Regiões Queijeiras e Municípios de Origem

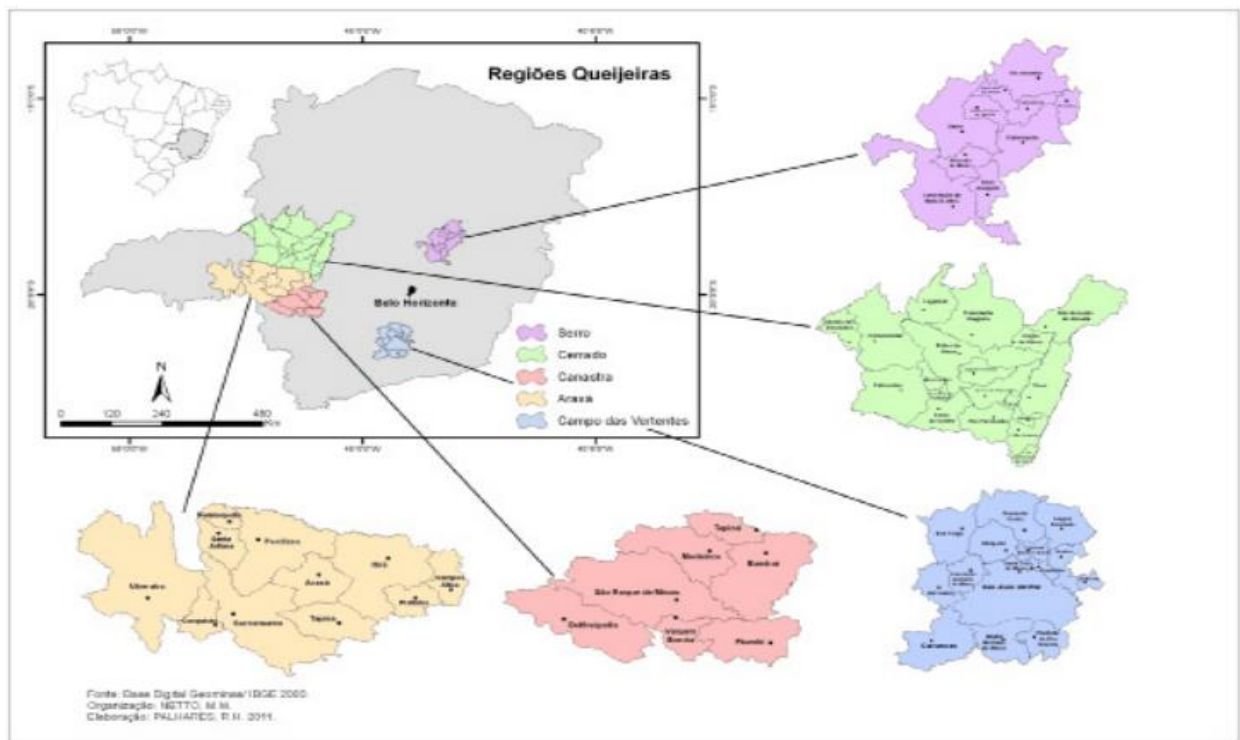


Figura 2: Mapa das Tradicionais Regiões Queijeiras de Minas Gerais. Fonte: Netto: (2012)

4.1.4 Aspectos Legais para comercialização do Queijo Minas Artesanal

A produção e a comercialização do QMA devem obedecer aos padrões legais para um melhor controle e melhoria da qualidade dos produtos. Para MARTINS et al., (2014) a comercialização de alimentos artesanais de forma segura é um dos principais desafios enfrentados pelos produtores que vivem da agricultura familiar no Brasil, segundo os autores esses produtos recebem pouca atenção do governo e de agências de fomento de pesquisas que investem em seu desenvolvimento.

Conforme a Lei Estadual 20.549 que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, é necessária atenção ao controle de qualidade em todas as etapas de produção até a comercialização. Assim compete ao IMA, a fiscalização e controle de todo processo produtivo conferido- lhe a aplicação de penalidade ao descumprimento da lei, a mesma dispõe dos atos autorizativos para a comercialização dos queijos artesanais tendo como requisito o registro ou o título de relacionamento, ambos emitidos pelo órgão de controle sanitário do Estado e pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) auditado pelo Estado (ALMG, 2012).

Para que o produtor rural das regiões caracterizadas atenda à legislação e se cadastre junto ao IMA é necessário integrar-se à Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG) do seu município e faça parte do Programa de Melhoria do Queijo Minas Artesanal. Programa de iniciativa da EMATER e que têm como principal objetivo garantir a segurança alimentar por meio do controle sanitário no processo de produção, do incentivo e fortalecimento da organização dos produtores, cadastro e busca da certificação de origem (ALMG 2012). A análise dos dados do IMA demonstraram que 263 produtores estão cadastrados ao programa de queijo Minas Artesanal (IMA, 2018).

Segundo a Portaria do IMA nº 1736 de 27 de julho de 2017 o período de maturação deve também atender aos padrões legais. Considerando a necessidade de inclusão do período de maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Serra do Salitre e Triângulo Mineiro, passa a vigorar a seguinte redação: Período de maturação do Queijo Minas Artesanal mínimo de 14

(quatorze) dias para a microrregião de Araxá, mínimo de 17 (dezessete) dias para a microrregião do Serro, e mínimo de 22 (vinte e dois) dias para as microrregiões da Canastra, do Cerrado, Campo das Vertentes, Serra do Salitre e do Triângulo Mineiro, até que sejam feitas novas pesquisas alterando os referidos tempos de maturação. No entanto mais estudos que avaliem a microbiota bacteriana dos queijos e a possível presença de enterotoxinas produzidas nos diferentes períodos de maturação, são necessários.

O Governo de Minas Gerais, por meio da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SEAPA), utiliza de metodologias para a regularização dos produtores de QMA. Há exigências para a regularização e comprovação do registro de atividade junto ao IMA e também o cumprimento de boas práticas de fabricação, sanidade do rebanho e saúde dos trabalhadores. O que garante melhoria na qualidade de produção e, ao mesmo tempo aumenta o número de produtores regularizados no estado, o que reduz a informalidade e garante a oferta de um produto mais seguro aos consumidores (EMATER-MG 2017).

Toda fiscalização exercida pelas autoridades sanitárias é necessária tendo em vista que o QMA pode ser um potencial veículo de patógenos como: *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Staphylococcus* spp enterotoxigênicos (OLIVEIRA et al., 2013).

4.2 *Staphylococcus* spp

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies, está inserido no filo Firmicutes e pertence à família Staphylococcaceae (SCHLEIFER et al., 2015). São Cocos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos não esporulados, imóveis e mesofílicos podendo crescer entre 6,7 e 48°C, com temperatura ótima de 37°C, crescendo em baixa umidade com pH entre 4 e 10, sendo o ótimo em 7,0, com capacidade de crescer em elevado teor de NaCl (BAIRDPARKER, 1990; FRANCO et al., 2002). As colônias em ágar base são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (KLOSS, 1991).

Staphylococcus spp. possui característica extrínseca que o diferencia em dois grupos os que são: *Staphylococcus* coagulase positiva, incluindo as espécies: *S. aureus*; *S. hyicus*; *S. lutrae*; *S. intermedius*; *S. pseudintermedius*; *S. schleiferi* e *S. delphini* e *Staphylococcus* coagulase negativa, incluindo todas as demais espécies (KLOOS et al., 1994; CUNHA et al., 2002; CHANG et al., 2003; ROSS et al., 2005; SINGHAL et al., 2006).

A enzima coagulase está relacionada à linha de defesa do microrganismo sendo responsáveis pela virulência de *Staphylococcus* spp. (MARTINEZ et al., 2001). Espécies de *Staphylococcus* que produzem a coagulase na presença do plasma têm por finalidade converter a fibrina em fibrinogênio dificultando a ação de células fagocitárias (SILVA 2014). De acordo com BERGDOLL (1989) uma estirpe produtora de coagulase pode ser considerada como potencialmente produtora de enterotoxinas.

Além da coagulase *Staphylococcus* produzem outras enzimas como fator de virulência, como por exemplo, a catalase, DNase, fibronolisina, hemolisina, hialuronidase, lipases, protease e Beta-lactamases e toxinas como as enterotoxinas, toxinas esfoliativas e toxina do choque tóxico (TSST-1). As bactérias desse gênero também têm como característica fermentar açúcares, como manitol e maltose (LACHICA et al., 1969). Estão presentes na pele, mucosas, trato respiratório e intestinal do homem, destacando-se, o *S. aureus* considerado microrganismo nosocomial de maior virulência responsável por boa parte das infecções (SANTOS et al., 2007).

Vários autores relatam que *S. aureus* é a espécie mais comum em surtos de intoxicação alimentar, considerando as características intrínsecas do patógeno, o mesmo faz parte da microbiota indígena e transitória dos seres humanos, sendo facilmente carregado por manipuladores em indústria de alimentos, quando os mesmos não adotam as boas práticas de fabricação (BPF) (STAMFORD et al., 2006; MACHADO et al., 2009). Entretanto, outras espécies apresentam potencial enterotoxigênico, dentre elas estão, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. warneri* (VALLE et al., 1990; JAY, 1992).

4.2.1 Enterotoxinas Estafilocócicas

A legislação brasileira, pela resolução-RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001 que confere à ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ações de controle sanitário na área de alimentos visa segurança à saúde da população e a regulamentação de padrões microbiológicos para alimentos, estabelece apenas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL 2001). Entretanto alguns autores já relataram *Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente produtoras de enterotoxinas (OLIVEIRA 1999; EMBRAPA, 2011). A não inclusão desse grupo como parâmetro de qualidade talvez se deva ao fato da baixa incidência de linhagens enterotoxigênicas. Segundo JAY (1992), embora já tenham encontrado *Staphylococcus* coagulase negativa produtora de toxina considera-se que não é parâmetro para adicionar a legislação, devido os casos serem menor comparado a coagulase positiva. No Brasil o único laboratório de saúde pública que pesquisa enterotoxinas estafilocócicas é o Laboratório de Enterotoxinas de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG). Assim, maiores investimentos tornam-se necessários para uma avaliação mais criteriosa sobre o potencial enterotoxigênico dos isolados coagulase negativa.

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) são exoproteínas termoestáveis, resistente à pepsina. As SEs são formadas por uma única cadeia constituída por aproximadamente 220-240 aminoácidos com um peso molecular variando de 25 a 30 kda (WU et al., 2016). Pertencem a uma ampla família de superantígenos (SAGs), consideradas proteínas curtas, solúveis em água e soluções salinas, resistentes ao tratamento térmico e baixo pH, resistentes também à hidrólise pelas enzimas gástricas que mantém sua atividade no trato digestório após ingestão (LE LOIR et al., 2003; ARGUNDIN et., al 2010).

De acordo com vários autores os genes que codificam SEs têm diversos suportes genéticos. As SEs: SEA, SED, SEE e SEJ são codificadas por bacteriófago, SEH e SEP por plasmídeos e também por cromossomo, SEB, SEC, SEG, SEGV, SEI, SEIV, SEM, SEN, SEO, SEK, SEL e SEQ por ilhas de patogenicidade cromossomal (BAYLES e IANDOLO, 1989; SU e WONG, 1995; JARRAUD et al., 2001; OMOE et al., 2002; BLAIOTTA et al., 2004).

Para o *International Nomenclature Committee for Staphylococcal superantigen Nomenclature* (INCSSN) somente superantígenos que induzem vômito por administração oral em experimentos utilizando primatas são denominadas de enterotoxinas estafilocócicas (LINA et al., 2004). Dentre as SEs que causam vômito podemos destacar: (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH SEI, SER, SES e SET) enquanto outras toxinas, porém, que não causam vômito nesse modelo experimental (SEL e SEQ) e as que ainda não foram testados (SEJ, SEK, SEM a SEP, SEU SEV são mencionadas como enterotoxinas estafilocócicas semelhante a superantígenos (LINA et al., 2004; ARGUNDIN et al., 2010). Na literatura há várias informações sobre SEs que podem variar entre os tipos, descoberta e sua importância na intoxicação alimentar estafilocócica (LE LOIR et al., 2003).

Atualmente 23 sorotipos de enterotoxinas estafilocócicas já foram identificados (WU et al., 2016). BARAN et al., (2017) citam SEA, SEB, SEC, SED e SEE como responsáveis por 95% das intoxicações alimentares. Vários autores demonstraram em seus estudos que a enterotoxina SEA é a mais comum envolvida em intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* spp. (ARGUDÍN et al., 2010; WU et al., 2016; BARAN et al., 2017).

Estudos de detecção de enterotoxinas feitos por ORNELAS et al., em (2012) com 40 amostras de queijo coletadas de 5 municípios da Serra da Canastra constataram que 100% dos queijos analisados apresentaram-se positivos para enterotoxinas estafilocócicas (SEB, SEC e SED), não apresentado SEA. Para LE LOIR et al., (2003) embora os testes imunológicos utilizados para detecção de enterotoxinas sejam mais rápidos e de custo baixo, a relevância desses testes ainda está sendo discutida. O fato de não ter apresentado SEA nos estudos feitos por ORNELAS pode estar relacionado à matriz alimentar e a concentração das SEs em níveis detectáveis pelo método utilizado, OSP.

4.2.2 *Quorum Sensing* e produção de enterotoxinas estafilocócicas

O mecanismo de *quorum sensing* é um meio de comunicação utilizado pelas bactérias (SCHAUDER et al., 2001; MILLER et al., 2001; KELLER et al., 2006). Esse mecanismo permite que uma população bacteriana controle a expressão gênica de toda a comunidade (SCHAUDER et al., 2001). Para AMMOR et al., (2008) o mecanismo de *quorum sensing* utilizado por bactérias tem grande relevância na microbiologia de alimentos em específico na deterioração de alimentos. SOLA et al., (2012) demonstraram que esse meio de comunicação célula-célula, esteja presente nos processos que envolvem a deterioração de alimentos e até mesmo no controle de patógenos alimentares.

A microbiota dos alimentos pode sofrer mudanças decorrentes das alterações no processo de produção, o que pode propiciar à expressão de genes em resposta as condições do meio (SMITH et al., 2004). Peptídeos auto indutores (Ais) são produzidos e liberados pelas bactérias que assim percebem e liberam sinais pelo *quorum* por meio de ativação ou repressão de genes (VIANA, 2006).

LE LOIR et al., (2003) em seus estudos com *Staphylococcus aureus* e intoxicação alimentar demonstraram que a expressão do gene *agr* (gene regulador) está inteiramente ligado a expressão de algumas SEs, no caso *S. aureus* a expressão desse gene tem por capacidade aumentar a densidade celular, essa densidade estando elevada (10^6 UFC/g) no alimento pode modular fatores ambientais, desempenhando um papel importante na expressão do gene SEs.

Quorum sensing é extremamente importante na regulação de diferentes fenótipos tais como: síntese de bacteriocinas, toxinas e outros fatores de virulência (CHARLIER et al., 2009). Segundo LE LOIR et al., (2003) genes reguladores são expressos por microrganismos quando estes atingem determinada concentração, resultando na regulação de diversas funções biológicas tais como produção de toxinas. O que possivelmente pode ser um fator importante nas pesquisas de identificação de genes que controlam a expressão de enterotoxinas.

4.2.3 Intoxicação Alimentar por Enterotoxinas Estafilocócicas

As doenças de origem alimentar provenientes do consumo de alimentos com carga microbiana contaminante representam um potencial risco à saúde da população (OLIVEIRA 2013). Dentre as doenças de origem alimentar a intoxicação estafilocócica manifesta-se logo após o consumo do alimento contendo enterotoxina (DORES 2013).

Para MURRAY (2005) os sintomas de intoxicação alimentar por enterotoxinas estafilocócicas podem ocorrer por uma pequena quantidade de enterotoxina, 0,5 µg/mL. De acordo com WU et al., (2016) vários alimentos podem ser contaminados por SEs, especialmente alimentos úmidos e proteicos. OLIVEIRA et al., (2016) destacam em seus estudos que a manipulação dos alimentos por indivíduos portadores da bactéria em suas mãos oferece um potencial risco de contaminação e a ingestão do alimento contaminado contendo toxina pré-formada traz riscos de intoxicação alimentar. Os estudos feitos por BARAN et al., (2017) demonstraram que a causa de intoxicação alimentar pelo consumo de queijo contaminado se dá pela presença de linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos presentes no produto, sendo por contaminação direta no processo de produção como também contaminação cruzada durante a produção.

Os sintomas causados pela intoxicação estafilocócica são diarreia, vômito, cefaleia, náuseas, dores abdominais, suor excessivo e em alguns casos desidratação, aproximadamente, trinta minutos após a ingestão, com duração aproximada de um dia, mesmo não sendo considerada como uma doença grave, em pessoas idosas, imunossuprimidas e crianças de pouca idade podem ser fatais (BRASIL, 2010; OLIVEIRA 2016).

Em 1998 em Minas Gerais, aproximadamente 8000 pessoas se reuniram para um evento religioso. Poucas horas após o consumo de uma galinhada, 4.000 pacientes apresentaram gastroenterite aguda, e aproximadamente 2000 foram atendidos pelo setor de emergência de 26 hospitais locais, dentre os pacientes internados, dezesseis, crianças e idosos foram a óbito. A investigação chegou à conclusão de que houve contaminação por linhagens enterotoxigênicas de

Staphylococcus aureus durante o preparo do alimento servido, (CARMO et., al 2004).

DIAS (2012) relatou surtos de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* ocorridos em municípios mineiros no período de janeiro de 2006 a abril de 2007, durante esse período foram notificados 72 surtos de intoxicação alimentar envolvendo o consumo de 173 alimentos suspeitos dentre eles, arroz, pernil, farofa, salpicão, macarronada, coxinha, bolo confeitado, carne de boi e queijo, com aproximadamente 1.762 pessoas. As amostras de alimentos foram submetidas à análise e os microrganismos isolados. Vinte e sete surtos foram confirmados pela contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva ($>10^5$ UFC/g) e pela presença de enterotoxinas nos alimentos analisados.

Neste cenário torna-se evidente a importância dos serviços prestados pelas autoridades sanitárias no âmbito federal, estadual e municipal exercendo com maior rigor a fiscalização como também a notificação de surtos. Sobretudo práticas de higiene são indispensáveis em toda linha de produção. Garantido qualidade e, segurança microbiológica desejada dos produtos, evitando ocorrência de crescimento microbiano contaminante, produção enterotoxinas e consequentemente surtos de intoxicação alimentar (FRANCO, 2002).

4.2.4 Surtos de intoxicação estafilocócica pelo consumo de queijo

Na literatura há vários relatos de surtos de intoxicação alimentar pelo consumo de queijo, os relatos de surtos envolvendo esse alimento trazem alerta aos consumidores que prezem pela procedência do produto consumido, como também alerta aos pequenos e grandes produtores que prezem pela produção de um produto seguro de ser consumido (SABIONI et al., 1988; CARMO et al., 2002; RUWER et al., 2011).

Em 1987 na cidade de Ouro Preto (MG) houve um surto de intoxicação pelo consumo de queijo Minas, quatro pessoas da mesma família, sendo que o pai a mãe e uma filha consumiram o alimento no mesmo horário e em torno de uma hora apresentaram sintomas de intoxicação alimentar, o outro filho do casal consumiu no dia seguinte o mesmo queijo e apresentou os mesmos sinais sintomas. A análise do produto confirmou que o queijo Minas estava contaminado por *Staphylococcus aureus* com contagem de $9,3 \times 10^7$ UFC/g, o microrganismo isolado era produtor de SEA, SEB, SED e SEE (SABIONI et al., 1988).

Em 1999, ocorreu no município Manhuaçu, MG um surto de intoxicação alimentar envolvendo aproximadamente 50 pessoas. Duas horas após o consumo de queijo Minas de origem caseira, os indivíduos envolvidos manifestaram sinais e sintomas de intoxicação alimentar (CARMO et al., 2002).

Na Paraíba dados coletados da vigilância epidemiológica do estado entre 2004 e o primeiro semestre de 2008 demonstraram que *Staphylococcus aureus* foi o responsável por 50% de contaminação envolvendo queijo, tendo 23,8% casos de surtos notificados (RUWER et al., 2011).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 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.

Após o mapeamento dos pequenos produtores situados nas microrregiões tradicionalmente produtoras de queijo procedeu-se à coleta das amostras. As amostras coletadas foram 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 de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) para a verificação do seu potencial enterotoxigênico.

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 para a verificação do potencial enterotoxigênico a Técnica de Extração Membrana sobre Agar. A Pesquisa das Enterotoxinas realizada pelo método *Optimum Sensitive Plate* – OSP - (APHA, 2001).

5.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Vinte e cinco gramas da amostra foram pesadas em bolsas plásticas estéreis e, em seguida, adicionados 225 ml de solução salina- peptonada (diluição 10^{-1}), para realização de diluições sucessivas (10^{-2} e 10^{-3}). Um volume de 0,1 mL de cada diluição foi inoculado na superfície de placas contendo Ágar Baird-Parker 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 com coloração negra ou cinza, brilhante, forma arredondada, convexa, com bordas regulares, circundadas por um halo branco (lipase) e outro externo maior transparente (lecitinase). Foram consideradas como colônias atípicas aquelas sem halo ou um único halo.

Colônias típicas e atípicas (n=5) foram repicadas para tubos de hemólise contendo caldo BHI e 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. Os isolados coagulase positiva foram testados para as provas de DNase, Manitol, Maltose, Hemólise em Agar Sangue e agrupados (pool) de acordo com o perfil bioquímico apresentado.

A contagem de *Staphylococcus* Coagulase positiva encontrada nas amostras analisadas foi comparada com o parâmetro estabelecido pela Legislação Vigente (Resolução da Diretoria Colegiada – RDC12/2001 MS) (Brasil, 2001) que estabelece uma tolerância máxima para esta categoria de produto de 10^3 UFC de *Staphylococcus* coagulase positiva/g.

5.2 Verificação do potencial enterotoxigênico dos isolados

Placas de Petri contendo 20 mL de ágar Infuso de Cérebro de Boi (BHI agar) 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, estéril, de igual diâmetro.

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

Para a verificação do potencial enterotoxigênico dos isolados foram preparadas placas de Petri de 50x12 cm, com 3 mL 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 (SEA, SEB, SEC e SED) 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 padrões de toxina e anti-toxina (FRI100-SEA, FRI361-SEC, FRIS6-SEB e FRI1151m-SED) foram produzidos pelo Laboratório de Enterotoxinas da FUNED-MG.

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 a presença de *Staphylococcus* spp. produtor de enterotoxina (SEA, SEB, SEC ou SED).

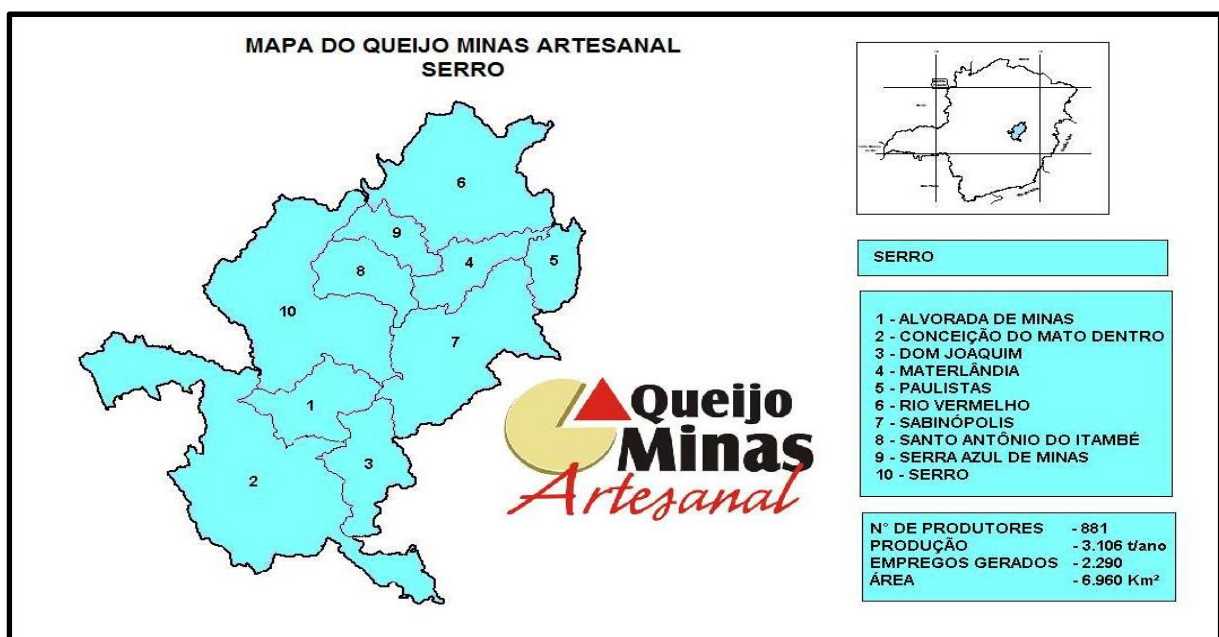
6 RESULTADO E DISCUSSÃO

Durante o período proposto amostras de QMA de 25 pequenos produtores localizados nas microrregiões do Serro, Cerrado e Canastra abrangendo os municípios do Serro, Materlândia, Sabinópolis, Alvorada de Minas, Carmo da Paraíba, Rio Vermelho, Paulistas e Medeiros foram avaliadas quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e verificado o potencial enterotoxigênico dos isolados para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED.

De acordo com a legislação brasileira a comercialização de queijos produzidos com leite cru é permitida apenas com cura mínima de 60 dias que, em princípio, garante a sua inocuidade pela redução/eliminação de patógenos. A não observância do período de maturação restringe a sua comercialização em apenas em seu estado de origem, e na informalidade.

A maioria dos produtores que participaram deste estudo residem nos municípios situados na microrregião do Serro conforme pode ser observado na Figura 03.

Figura 3- Municípios da Microrregião do Serro Produtoras de queijo Minas Artesanal



Fonte: EMATER-MG (2018)

O período de cura adotado pelos pequenos produtores variou entre 5 e 39 dias, porém, a maioria (16/25 amostras) maturam seus queijos por 5 a 10 dias (tabela 01), logo, nenhum produtor atende à legislação vigente. Sessenta e oito por cento adotam a temperatura de refrigeração (entre 3 e 9°C) na maturação dos queijos produzidos (tabela 01). A cura por um período menor que o estabelecido pela legislação vigente pode proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento de patógenos como *Staphylococcus* enterotoxigênicos representando um risco para saúde dos consumidores (Le Loir et al., 2003).

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

Tempo de Maturação (Dias) Média= 22	Nº de amostras	Nº de amostras maturadas a temperatura de refrigeração (3-9°C) para n=25.	
		Nº	%
05-10	16	15	60
11-20	04	02	08
21-30	02	0	0
31-39	03	0	0
Total	25	17	68

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

A curva de crescimento de microrganismos é influenciada pela temperatura e, de acordo com DORES (2013) a refrigeração inibe o crescimento de bactérias desejáveis no processo de maturação comprometendo as reações metabólicas que ocorrem durante a cura e favorecendo a manutenção de microrganismos patogênicos, quando presentes.

Neste estudo é possível observar que a maioria dos queijos mantidos sob refrigeração apresentou contagem *Staphylococcus* coagulase positiva superior ao permitido pela legislação (mais de 10^3 UFC/g). Os resultados estão de acordo com os encontrados por BORELLI et al., (2011) que em seus estudos sobre *Staphylococcus* spp isolados de queijo Minas, observaram que, amostras com menos de 7 dias de cura apresentaram contagem acima de 10^3 UFC/g e aqueles com 7 e 15 dias apresentaram contagens acima de 10^5 UFC/g.

Na tabela 2 encontra-se o perfil de aprovação/reprovação das amostras de QMA produzidas nas microrregiões avaliadas, para o parâmetro *Staphylococcus*

coagulase positiva, (RDC nº12 de 2001 MS) e a incidência de linhagens enterotoxigênicas.

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

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

*A: Aprovada

*R: Reprovada (acima de 10^3 UFC/g)

*S: Potencialmente capaz de causar surto (acima de 10^5 UFC/g)

*Critérios de Aprovação/Reprovação: RDC nº12 de 2001 MS

A análise dos resultados revelou que, das 25 amostras de queijo produzidas por 25 pequenos produtores avaliados neste estudo, 84% estavam impróprias para o consumo por não atenderem a legislação vigente. Das amostras reprovadas 36,0% eram potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

A intoxicação alimentar é uma síndrome resultante da ingestão de alimento contendo enterotoxinas pré-formadas, neste estudo *Staphylococcus* coagulase positiva produtor de SEA foi isolado em apenas uma amostra de queijo analisada. De acordo com EVENSON et. al, (1988) enterotoxina A (SEA) é responsável pela maioria dos casos de intoxicação em humanos; Segundo os autores, 100ng da proteína é capaz de induzir quadro de gastroenterite aguda caracterizada por evolução rápida e curta duração.

Cabe ressaltar que já foram descritas mais de 17 enterotoxinas responsáveis por desencadear sinais e sintomas de intoxicação e neste estudo foram pesquisadas apenas as enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC e SED). As amostras com elevada contagem do microrganismo podem conter linhagens produtoras de outras enterotoxinas não testadas neste estudo.

FILHO et al., em (2007) avaliaram produção de enterotoxinas por 72 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Os resultados encontrados foram superiores aos resultados encontrados neste trabalho, os autores verificaram que 91,7% das cepas produziam pelo menos um tipo de enterotoxina, isoladamente ou em associação. A elevada incidência de linhagens enterotoxigênicas encontrada

pelos autores pode estar relacionada à origem dos isolados, ou seja, rebanho já apresentando o quadro de mastite. A atividade de superantígeno apresentada pelas enterotoxinas é um fator de virulência que contribui com a colonização do úbere animal e conseqüentemente com a evolução da infecção

Outra hipótese poderia explicar a diferença de resultados encontrada, embora as amostras de queijo analisadas tenham apresentado elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva é que os genes que expressam as toxinas são modulados por fatores ambientais como temperatura, pH e microbiota presente (Le Loir et. al, 2003). Segundo Le Loir et. al, (2003) peptídeos auto- indutores são liberados por microrganismos quando estes atingem determinada concentração. Tais peptídeos são responsável pela comunicação celular resultando na regulação de diversas funções biológicas como ativação/desativação da expressão de genes relacionados à produção de toxinas, fenômeno chamado de “quorum sensing”.

O Serro foi à microrregião onde se concentrou a maioria dos pequenos produtores de Queijo Minas Artesanal avaliado neste estudo. Ao analisar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrada nas amostras por município de origem observa-se que quase a metade não atende à legislação vigente para este parâmetro e 16% são potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar (Tabela 3).

Tabela 3: Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrada nas amostras de queijo Minas Artesanal, coletadas entre 2017 e 2018, fabricados por pequenos produtores localizados em diferentes municípios das microrregiões mineiras.

Municípios	N° Produtores	Microrregiões	N° de Amostras com contagem entre 10 ³ e 10 ⁴ UFC/g		N° de Amostras com contagem acima de 10 ⁵ UFC/g	
			N	%	N	%
Serro	13	Serro	2	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	
Paulistas	1	Serro	1	4	0	4
Medeiros	3	Canastra	2	12	0	0
TOTAL	25	3	11	88	9	40

*Observação: Limite de tolerância baseada na RDC n°12 2001 MS, para o parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva.

7 CONCLUSÃO

O município do Serro representa a localidade com o maior número de produtores de Queijo Minas artesanal avaliado neste estudo.

A maioria dos pequenos produtores de Queijo Minas Artesanal produzem queijos que não atendem a legislação vigente quanto ao parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva.

Quase a metade das amostras analisadas apresentaram uma carga de *Staphylococcus* coagulase positiva que as tornavam potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

E as linhagens isoladas de Queijo Minas Artesanal produzidos nas diferentes regiões queijeiras apresentaram um baixo potencial enterotoxigênico para as enterotoxinas testadas.

E o efeito “*Quorum sensing*” pode ter contribuído para os resultados encontrados. Assim novos estudos deverão ser realizados a fim de se verificar a sua participação sobre a produção de enterotoxinas estafilocócicas em Queijos Minas Artesanal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMG, Assembleia Legislativa de Minas Gerais, **Lei nº20.549**, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, 2012. Disponível em:

<<https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=20549&ano=2012>>. Acesso em: 09 ago. 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.

APHA - **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 39.66- Surface Plating Procedure, 39.64 - Description of *S. aureus* Colonies on Baird-Parker agar, 39.66- Coagulase Test. 5nd ed. Washington, D.C, 2015.

AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of *quorum sensing* in food spoilage. **Journal of food protection**, v. 71, p.1510-1525, 2008.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA. C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Journal Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, jul. 2010.

BAYLES, K. M.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analysis of the gene encoding *Staphylococcal* enterotoxina D. **Journal of Bacteriology**, v.171, p.4799-4806, 1989.

BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.1 p. 8, 1990.

BERGDOLL, M.S. ***Staphylococcus aureus***. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker v.1, p.463-523.1989.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO,V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILANI, F. 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.

BARAN, A. B.; ERDOĞAN, A.; TURGUT, T.; ADIGÜZEL, M. C. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. **Journal of Nature and Science**, v.6, n. 2 p. 100-105, 2017.

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v.129, p.1001-1011, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal: Anexo I: Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para Seu Relacionamento Junto ao Serviço de

Inspeção Federal. **Resolução nº. 07, de 28 de novembro de 2000.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de Janeiro de 2001.** Estabelece padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 Jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p.158 (Série A. Normas e Manuais Técnicos) 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 ago. 2013.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. And other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.545-550, São Paulo Oct./Dec. 2006.

BORELLI, B.M; LACERDA, I. C; BRANDÃO, L. R.; VIANA, C.R.; FERREIRA, M. C.; GOMES, F. C. O.; CARMO, L. C.; HENEINE, L.G.D.; ROSA, S. A. Identificação de *Staphylococcus* spp. isolado durante o processo de maturação de um tradicional queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.481. 2011.

CARDOSO, V. M.; DIAS, R. S.; SOARES, B.M. CLEMENTINO, L. C.; ARAÚJO, C.P; ROSA, C. A. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.3, p.743-749, 2012.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v.19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARMO, L. S.; CUMMINGS, C. LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, M. J.; SENA, M. J.; JETT, M. A Case Study of a Massive *Staphylococcal* Food Poisoning Incident. **Foodborne pathogens and disease**, v.1, n.4, p.1-6, 2004.

CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LOIR, Y. L. 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.

CHANG, M. R.; CARVALHO, N. C. P.; OLIVEIRA, A. L. L.; MONCADA, P. M. F.; MORAES, B. A.; ASENSI, M. D. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p.149-160, 2003.

CUNHA, M. L. R. S.; LOPES, C. A. M.; RUGOLO, L. M. S. S.; CHALITA, L. V. A. S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **Journal Pediatrics Brazil**, v. 78, n. 4, p. 279-288, 2002.

DORES, M. T. **Queijo Minas artesanal da Canastra Maturado a temperatura sob-refrigeração**. 2007, 103f. Dissertação, (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa 2007.

DORES, M. T. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* Isolados de Queijo Minas Artesanal da Canastra**. 2013, 78f. Tese, (Doutorado em Ciência e tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa 2013.

DIAS, R. S. Surtos de intoxicação alimentar por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* ocorridos em diferentes municípios mineiros. **Periódico Científico do Núcleo de Biociência Centro Universitário Metodista Isabela Hedridrx**, Belo Horizonte, v. 2, n.4, p.6, Dez. 2012.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU K. Diversidade microbiana, dinâmica e atividade durante a fabricação e amadurecimento do queijo DOP Castelmagno. **International Journal of food microbiology**, v.143, p. 71-75, 2010.

EMPRAPA, Empresa Brasileira de Agropecuaria. Perfil de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento 52**. ISSN 1679-6543, 2011.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/25401590/pesquisa-contribui-para-caracterizacao-de-queijo-artesanal-da-serra-da-mantiqueira.2017>>. Acesso em: 06/07/2018

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing nomenclature. Paris, 19 Dec. 2016.

EMATER, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Programa Queijo Minas Artesanal 2018. Disponível em:

<http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_queijo&id=3301>. Acesso em: 07/06/2018.

EVERSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNTEIN, R. S.; BERGDOLL, M. S. Estimation of human dose of *Staphylococcal* enterotoxin A from a large outbreak of *Staphylococcal* food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.7 p.311- 316, 1988.

FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismo em queijos. **Revista Leite e Derivados**, v.13. n. 76, p. 91-96. Mar/Abr 2004.

FERREIRA, J. A. F. F. **Panorama das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil entre 200 a 2015**. 2017, 78f. Dissertação,(Mestrado em Nutrição e Saúde Pública). Programa de Pós graduação em Nutrição e Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública de São Paulo, 2017.

FILHO, N. F.; FERREIRA, L. M; AMARAL, L. A.; ROSSI, O. D.; OLIVEIRA, R. P. 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.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 184p, 2002.

FOX, P. F; LAW, J.; McSWEENEY,P.L.H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P.F **Cheese: Chemistry, Phycs and Microbiology**. Major cheese groups. London U.K. 1993, Ed. 2, p.388-438, 1993.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and it food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 1.736**, de 27 de julho de 2017. Dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas, 2017. Disponível em:

<<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=346814>> Acesso em 15/10/2018

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. **Regiões produtoras de queijo Minas artesanal** 2018. Disponível em:

<<http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal>>. Acesso em 07/09/2019

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária artesanal. **Lista de produtores cadastrados no programa de queijo Minas Artesanal**, 2018. Disponível em:

<<file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/produtores-qma-15-10-2018.pdf>> Acesso em 26/10/2018.

IPHAN, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Decreto nº 3.551**, de 4 de agosto de 2000, que institui o Queijo Artesanal de Minas Gerais como Patrimônio Cultural e Imaterial do Brasil v.1, 2000.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers**. Washington, DC: ASM Press, v.1, p.768,1997.

JARRAUD, S.; PEYRAT. M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M. MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE,M.; LINA, G. A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.

JAY, J. M. *Staphylococcal gastroenteritis* In: **Modern Food of Microbiology** (Nostrand, V. ed). 4th edn. New York USA, p.455-578, 1992.

JETT. M., BRINKLEY, W.; NEILL, R.; GEMSKI, P.; ROBERT, H. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B Challenge of Monkeys: Correlation of Plasma Levels of Arachidonic Acid Cascade Products with Occurrence of Illness. **Infection and Immunity**. v.58 p.3494–3499.1990.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; Winn, W. C. J. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 11, parte 1. 2001.

LEANDRO, J. J. **Queijo do Campo a Mesa** v.1, p.176, 2008.

LECITRA, G. World wide traditional cheeses: Banned for business? **Dairy Science & Technology** v. 1, p.19, 2010.

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

LACHICA, R. V. F.; WEISS, K. F.; DEIBEL, R. H. Relationships among coagulase, enterotoxin and heat stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**. V.18, n. 2 p.126-127, 1969.

MACHADO, J. R.; MARSON, J. M.; OLIVEIRA, A. C. S.; SILVA, P. R.; TERRA, A. P. S. Avaliação microbiológica das mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos da unidade de alimentação e nutrição de um hospital universitário. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v.11 p. 461-465, 2009.

MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; ALMEIDA, M. G. A. A.; ROCHA, C. C. M; PINHEIRO, D. P. M.; FIGUEIREDO, A. Caracterização de *Staphylococcus* ssp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2001.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. Viçosa, MG, Brasil, 146f (Tese de Doutorado do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; NATAN, J.; PIMENTEL, F. N.; RIBEIRO. J. I.; FURTADO, M.; FERREIRA, C. L. L. (2014) Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese **Brazilian Journal of Microbiology**. v.46, p.219-230 São Paulo Jan./Mar. 2014.

NETTO, M. M; NETTO, M. C. O Queijo Minas Artesanal e o Mercado Central de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: Uma Questão Cultural. In: ENCONTRO DE GEÓGRAFOS DA AMÉRICA LATINA, v.1, p.1-14, 2009.

NETTO, M. M. O Mercado Central de Belo Horizonte: Entre Queijos e Sabores. Geografissicade. Dossiê Sabores Geográficos Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: v.1, n.1, p 53-67. 2012. Disponível em:

<<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Geografiasocioeconomica/Geografiacultural/114.pdf>> Acesso em: 20/10/2018.

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

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento de *Staphylococcus enterotoxigênicos coagulase negativos* em alimentos**. 1999. 102f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas 1999.

OLIVEIRA, D. L. S. ***Staphylococcus* spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista *in vitro* frente a *Lactobacillus* spp.** 2012, 47f, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Área Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

OLIVEIRA, J. J.; REZENDE, C. S. M. R.; OLIVEIRA, A. P; MOREIRA, N. M.; FREITAS, F. A. Surtos alimentares de origem bacteriana. **Centro Científico Conhecer**. v.1 p. 18, 2013.

OLIVEIRA, K. M. O; CARVALHO, J. B; RAMOS, L. P. S. GELATTI, L. C. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais comercializados na cidade de Uruaçu-Goiás. **Revista Eletrônica de Ciências Humana Saúde e Tecnologia**, v.1, p. 63-70, 2016.

OMOE, K.; ISHKA, M. SHIMODA, Y.; HU, D.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring seg, seh, or se. Genes **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40 p. 857-862, 2002.

ORNELAS, E. A.; CERQUEIRA, M. O. P.; SILVA; CRISOLITA, M. C.; DIAS, R. S Perfil enterotoxigênico de amostras de queijo Minas artesanal produzidas na Serra da Canastra-MG. **Periódico Científico do Núcleo de Biociência Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix**, v. 2, n.4, p. 1-6, 2012.

PERRY, K. S.P. Queijos aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v.27, p. 293-300, São Paulo, 2004.

SABIONI, J. G. S; YOKO, E. H.; SOUZA, M.L.S. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v.22, n.5, p.458-461, 1988.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA, N. A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciências e tecnologia de Alimentos**. Campinas v.26, p. 41-45, 2006.

SU, Y. C.; WONG, A. C. Identification and purification of a new *Staphylococcal* enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61 p.1438-1443, 1995.

KELLER, L.; SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, London, v.4, p.249-257, abr/ 2006.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal of Infectious Disease**, v.189, p. 2334-2336, 2004.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**, Washington, 5.ed, p. 222- 237, 1991.

KLOSS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 7, p. 117-40, 1994.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, England, v.55, p.165-199, 2001.

MURRAY, R. J Recognition and management of *Staphylococcus aureus* Toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, v.35, p.106-119, 2005.

ROSSI, F. S.; CECCON, M. E. J. R.; KREBS, V. L. J. Infecções estafilocócicas adquiridas nas unidades de terapia intensiva neonatais. **Revista de Pediatria**, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2005.

RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): O problema do queijo coalho. **Segurança alimentar e nutricional**. Campinas, v.18, n.2, p.60-66, 2011.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**. v. 22, n.5, p. 458-461, 1988.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A. RODRIGUES, A. C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**. Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, dez. 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. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, p.75, 2000.

SILVA, J. G. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Artesanal da Canastra.** 2007, 220f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Lavras, 2007.

SILVA, E. G. **A segurança alimentar e relatos de surtos alimentares por *Staphylococcus* spp.** 2014, 74f. Monografia (Programa de Pós Graduação e Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes and development**, Cold Spring Harbor, v.15, n. 12, p.1468-1480, jun. 2001.

SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. ***Staphylococcus* Bergey's Manual of Arquea and Bacteria.** 2.ed. London New York, v. 3, p.1445, 2015.

SINGHAL, R.; DHAWAN, S.; MOHANTY, S.; DHAWAN, S. S. B.; DAS, B.; ARTI, K. Species distribution and antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in a tertiary care hospital. **Indian Journal of Medical Research.** v.123, p.569-570, 2006.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. *Quorum sensing*: A primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v.67, p.1053-1070, 2004.

SIHUFE, G.; ZORRILLA S.; PEROTTI M. C; WOLF, I. V; ZALAZAR, C. A; SABBAG, N. G.; SILVIA,C.; RUBIOLO, A. C. Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. **Food Chmistry**, v.119, p.101-107. 2010.

SHUPP, J. W; JETT, M.; PONTZER, C. H. Identification of a transcytosis epitope on staphylococcal enterotoxins. **Infection and Immunity**, v.70, p.2178-2186, 2002.

SOLA, M. C; OLIVEIRA, A. P; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. **Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na Microbiologia de alimentos** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brasil v.8, p.1419, 2012.

SPAULDING, A. R; SALGADO, P.; KOHLER, P; DONALD, Y. M; HORSWILL, A. R.; SCHLIEVERTA, P. M. *Staphylococcal* and *Streptococcal* Superantigen Exotoxins. **Journal Society for Microbiology**, v.26, p.422-447, 2013.

SCHEUBER, P. H, DENZLINGER, C.; WILKER, D.; BECK, G. Leucotrienos como mediadores da enterotoxina estafilocócica B no macaco. **EUR. Journal of Clinical Investistition.** v.1, p.455-459, out 1987.

TEBALDI, V. M.; OLIVEIRA, T. L.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de *Coliformes*, *Staphylococcus* e *Enterococos* de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p. 753-760, Campinas, jul./set. 2008.

URZEDO, A. C. B. **Avaliação do rendimento e maturação de queijos pecorino produzidos com leite de vaca e lipases de cabrito e cordeiro**, 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. 2008.

VALLE, J; GOMEZ, L.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A; VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, 1990.

VIANA, E. S. V. **Moléculas sinalizadoras de *quórum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotóficas isoladas de leite**. 2006. 176f. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, MG. 2006.

WU, S; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Journal Toxins**, v.8 p.176, 2016.

ZANUTTO, M. R. **Capacidade de adesão, invasão e produção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas com mastite subclínica e leite humano de um banco de leite**, 94f. Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microrganismos. Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, São Paulo, 2015.