

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE MATÉRIAS-PRIMAS  
PROCESSADAS DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA  
FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO  
PRETO/SP**

Adriana Jorge Drubi  
Nutricionista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE MATÉRIAS-PRIMAS  
PROCESSADAS DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA  
FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO  
PRETO/SP**

Adriana Jorge Drubi

Orientador: Dr. Fernando Antônio de Ávila

Co-Orientador: Dr. José Moacyr Marim

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO

Junho de 2005

D794e Drubi, Adriana Jorge  
Estudo microbiológico de matérias-primas processadas de origem animal utilizadas na fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto/SP / Adriana Jorge Drubi. -- Jaboticabal, 2005  
xii, 33 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005  
Orientador: Fernando Antônio de Ávila  
Banca examinadora: Ruben Pablo Schocken-Iturrino, Ana Cláudia Chesca  
Bibliografia

1. Microbiologia. 2. Microrganismos. 3. Contaminação. I. Título. II. Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.89

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ADRIANA JORGE DRUBI** – nascida em 06 de dezembro de 1964, na cidade de Colina- SP, graduada em Nutrição pela Universidade Metodista de Piracicaba- SP. Atualmente exerce a função de responsável técnica de uma indústria de alimentos e responsável pelo departamento do Controle de Qualidade desde 1998.

*“Na concorrência da vida, são muitos os contratemplos. As bactérias, os vírus e os fungos são apenas uma lembrança de que os erros e os descuidos estão dentro de nós mesmos”.*

(ENEO)

## **DEDICO**

Aos meus pais, Brahim e Eneida, que acreditando em mim dedicaram toda sua vida em prol da minha formação pessoal e profissional.

A minha avó Syria, exemplo de vida, que por meio da sua coragem, luta, amor e fé me fez crer que é possível transpôr todas as barreiras e vencer na vida.

Pelo amor e carinho de sempre, a vocês o meu eterno agradecimento.

## **OFEREÇO**

Ao meu mestre, Professor Doutor Fernando Antônio de Ávila, pela amizade e dedicação com que me acolheu e me orientou.

Minha sincera gratidão e amizade!

## **AGRADEÇO**

À Deus, que me fez instrumento da vossa fé. Confiando nele é possível realizar todos os nossos sonhos. Basta seguir seus ensinamentos e acreditar sempre.

Ao Prof. Dr. José Moacyr Marinho, meu co-orientador, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

À Profa. Dra. Ana Claudia Chesca, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo apoio e confiança de sempre.

Ao João Quintana, pelo apoio em todos os momentos.

Ao Sr. Carlos Afonso da Silveira Rocha, grande incentivador deste trabalho.

A REDE HABIB´S, na pessoa do Diretor da Master, Sr. Sebastião Vilhena, pela facilidade criada para execução deste trabalho, por acreditar em mim e pela amizade.

Ao Cláudio, meu companheiro e verdadeiro amigo, pela paciência, apoio e carinho em todos os momentos.

Ao meu irmão Brahim Filho, por suas idéias, sugestões, alegria contagiante e ajuda constante.

Aos meus amigos Renata, Luciene, Carolina, Débora, Luis Sérgio, Weverson, Aninha, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

A Edna, funcionária do Departamento de Microbiologia, que me acolheu com carinho e amizade.

A Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.



## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	04
2.1 Microrganismos indicadores da qualidade higiênica dos alimentos .....	04
2.1.1 Intoxicação alimentar por <i>Estafilococos</i> .....	04
2.1.2 Intoxicação alimentar por <i>Salmonella</i> .....	05
2.1.3 Intoxicação alimentar por <i>Escherichia coli</i> .....	07
2.1.4 Intoxicação alimentar por <i>Clostridium</i> .....	09
3 OBJETIVOS .....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1 Coleta das amostras .....	13
4.2 Isolamento bacteriano e análises de rotina .....	14
4.2.1 Pesquisa de <i>Salmonella sp</i> .....	14
4.2.2 Contagem de bactérias anaeróbicas mesófilas .....	14
4.2.3 Isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i> .....	15
4.2.4 Identificação sorológica .....	15
4.2.5 Determinação de coliformes totais e coliformes a 45° C .....	16
4.2.6 Contagem de <i>Staphylococcus sp</i> .....	17
4.2.7 Teste de sensibilidade a antimicrobianos .....	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
6 CONCLUSÃO .....	28
7 REFERÊNCIAS .....	29

**LISTA DE TABELAS**

Página

Tabela 1. Padrões e recomendações utilizadas para classificação dos resultados das análises bacteriológicas realizadas no queijo fresco, moído e temperado, carne moída e temperada e frango pré-cozido, desfiado e temperado .....	19
Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas das amostras de carne, queijo e frango destinadas à fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto-SP, em 2004 .....	23
Tabela 3. Número e porcentagem de enterobactérias isoladas e identificadas em nove amostras de queijo fresco, utilizadas como matéria-prima destinadas à fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto-SP, em 2004 .....	24

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de <i>Staphylococcus</i> .....	05
Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de <i>Salmonella</i> .....	07
Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura de <i>E. coli</i> .....	09
Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura de <i>Clostridium botulinum</i> .....	10
Figura 5. Porcentagem de sensibilidade a antimicrobianos das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de matérias-primas destinadas a alimentos em Ribeirão Preto-SP .....	26

## ESTUDO MICROBIOLÓGICO DE MATÉRIAS PRIMAS PROCESSADAS DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE ALIMENTOS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO/SP

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de matérias-primas alimentícias de origem animal na região de Ribeirão Preto (SP). Para tal foram utilizados três tipos de amostras: carne, queijo e frango, perfazendo respectivamente um total de 34, 38 e 25 amostras. Os resultados obtidos das análises microbiológicas para carne apresentaram ausência de *Salmonella sp* e valores abaixo do padrão permitido para coliformes fecais. Nas amostras de frango observou-se a ausência de *Salmonella sp*, e os agentes *Staphylococcus sp* e *Clostrídios* apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Do total de 38 amostras de queijo analisadas, foram encontradas nove (24,0%) com a presença de coliformes fecais acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente. Os principais gêneros ou espécies encontrados com maior frequência nestas amostras foram *Escherichia coli* (44,4%), seguidas por *Klebsiella sp* (22,2%), *Enterobacter sp* (11,1%), *Proteus sp* (11,1%) e *Citrobacter sp* (11,1%). Nenhuma das quatro cepas de *Escherichia coli* isoladas apresentaram aglutinação com os soros polivalentes A, B e C e respectivos monovalentes das espécies EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica). Os níveis de *Staphylococcus sp* encontrados ficaram dentro dos valores permitidos e *Salmonella sp* não foi detectada. Nas amostras de queijo foi realizado teste de sensibilidade utilizando-se o método de difusão em ágar com discos impregnados de antimicrobianos. Foram utilizadas as seguintes drogas: gentamicina, amicacina, sulfametoxazol+trimetoprima, ceftriaxona, aztreonam, ampicilina e cefalotina para as cepas de *Escherichia coli*. Os resultados revelaram que as cepas de *Escherichia coli* isoladas foram resistentes a diversos antimicrobianos, destacando-se 50,0% para sulfametoxazol+trimetoprima, 25,0% para o antibiótico aztreonama e 25,0% para cefalotina e ampicilina. Estes resultados sugerem que, dentre as amostras analisadas, o queijo foi a matéria-prima que se demonstrou menos adequada à comercialização e consumo, por oferecer um risco mais efetivo à saúde pública.

Palavras-chave: Alimentos, Clostrídios, coliformes fecais, contaminação, microrganismos, *Salmonella sp*

## MICROBIOLOGICAL STUDY OF PROCESSED RAW MATERIAL OF ANIMAL ORIGIN USED IN THE MANUFACTURE OF FOOD AT RIBEIRÃO PRETO REGION

**ABSTRACT** - The objective of this work was to evaluate the microbiology quality of the alimentary raw material of animal origin in the region of Ribeirão Preto. For such they were utilized three kinds of samples: meat, cheese and chicken, making up respectively a gross one of 34, 38 and 25 samples. The results obtained from the microbiological analyses for meat presented absence of *Salmonella sp* and down the values of the standard permitted for fecal coliforms. In the samples of chicken observed absence of *Salmonella sp*, and the agents *Staphylococcus sp* and *Clostridium*, presented itself inside the limits established by the Health Department. Of the gross one of 38 samples of cheese analyzed, were found nine (24,0%) with the presence of fecais coliforms above of the limits established by the force legislation. The main kinds or species met frequently in these samples were, *Escherichia coli* (44,4%), followed by *Klebsiella sp* (22,2%), *Enterobacter sp* (11,1%), *Proteus sp* (11,1%) and *Citrobacter sp* (11,1%). None of the four lineages of isolated *Escherichia coli* presented agglutination with the multivalence serum A, B and C and respective monovalence from the species EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica). The levels of *Staphylococcus sp* founded stayed inside the values permitted and *Salmonella sp* was not detected. In the samples of cheese was carried out sensibility test utilizing the approach of diffusion in ágar with disks impregnated of antimicrobes. They were utilized the following drugs: gentamicina, ampicilina, sulfametoxazol + trimetoprima, ceftriaxona, aztreonam, ampicilina and cefalotina for the lineages of *Escherichia coli*. The results revealed that the lineages of *Escherichia coli* isolated were resistant to diverse antimicrobes, detaching 50,0% for sulfametoxazol + trimetoprima, 25,0% for the antibiotic aztreonama and 25,0% for cefalotina and ampicilina. These results suggest that amongst the analyzed samples, the cheese was the raw material that showed to be less adequate to the commercialization and consumption by offer an effective risk to the public health.

Keywords: Sustenances, Clostridium, fecal coliforms, contamination, microorganisms, Salmonella sp

## 1 INTRODUÇÃO

Vive-se em uma época em que o consumidor encontra-se diante de um processo crescente de oferta de quantidades e qualidades de alimentos tanto *in natura* quanto industrializados.

Essa situação levanta inúmeros problemas relativos à segurança alimentar dos produtos consumidos, nomeadamente quanto à contaminação que decorre da responsabilidade dos produtores, das técnicas de produção e ainda dos consumidores que desconhecem as regras básicas de higiene e segurança na aquisição, conservação e processamento dos alimentos. Na maioria das vezes a ocorrência de intoxicação alimentar não é causada pela ingestão de alimentos deteriorados, mas sim pela ingestão de alimentos contaminados, com aparência, paladar e cheiro normais.

No Brasil, o consumo de queijo, carne e frango, devido à acessibilidade popular e ao grande valor nutricional, é tradicionalmente grande.

No caso do queijo, a qualidade do leite é de fundamental importância para a produção. As técnicas de processamento garantem uma fácil conservação do produto. A mistura pode ser preparada por processos adequados e a seguir moldada, prensada e salgada e até mesmo adicionada de bactérias, fungos ou especiarias (AQUINO, 1983).

É exigido que o leite destinado à fabricação de queijo seja higienizado por meios físicos ou submetido à pasteurização. Temperaturas inadequadas somadas a condições incorretas de armazenamento, contribuem de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (PEREIRA et al., 1999). Até chegar à fase de produto final o queijo Minas Frescal passa pelas seguintes etapas: pasteurização do leite, coagulação, enformagem, salga, embalagem e refrigeração. Durante essas fases operacionais, devem ser seguidas normas que evitem a contaminação do produto. Embora exista exigências para que o leite destinado à fabricação de queijos seja higienizado por meios físicos e submetido à pasteurização, é intensa a comercialização dos queijos fora de tais especificações (PEREIRA et al., 1999).

Os produtos de origem animal em geral têm recebido muita atenção por parte dos consumidores. São freqüentes as implicações como veículos de transmissão de doenças alimentares (NASCIMENTO et al., 1996). Os animais e os produtos de origem animal, como a carne, são os maiores reservatórios de *Salmonella sp.* Em muitos países, produtos à base de carne de frango constituem-se na principal causa de enterite humana (MEAD, 1989). Nos trabalhos de inspeção sanitária é grande o interesse em torno do diagnóstico, controle e medidas preventivas, quer pelas exigências de mercado interno, quer pelas exigências de exportação de carnes e seus derivados (PARDI et al., 1995). *Salmonella sp.* é um dos enteropatógenos humanos mais freqüentemente associados à microbiota entérica das aves e origina-se de diferentes fontes no ambiente avícola e as características de colonização do trato intestinal das aves são também diferentes (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1997).

Além de *Salmonella sp.*, a ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7, sorotipo extremamente patogênico para humanos, requer uma maior atenção por parte dos órgãos de controle e inspeção, já que há indicações de que esta é passível de ocorrer em produtos avícolas (DOYLE & SCHOENI, 1987).

Os coliformes em geral são considerados microrganismos indicadores e, quando presentes em um alimento, fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO & ALMEIDA, 1992; TAVARES & GARCIA, 1993; CARVALHO et al., 1996; FRANCO & LANDGRAF, 1996; LIMA, MENDES & MENDES, 1996).

A definição de coliformes fecais é a mesma de coliformes totais, porém restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com a produção de gás, em 24h a 44,5-45,5°C. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrointestinal. Atualmente sabe-se, entretanto, que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes fecais em alimentos é menos

representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, porém muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *Escherichia coli* dentro do grupo fecal.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microrganismos indicadores da qualidade higiênica dos alimentos

#### 2.1.1 Intoxicação alimentar por Estafilococos

Um microrganismo que normalmente causa intoxicação alimentar, é o *Staphylococcus aureus* (Figura 1), podendo ser encontrado na superfície da pele, principalmente em torno do nariz e em algumas infecções cutâneas. Quando este agente contamina os alimentos, se eles não forem cozidos a uma temperatura de 60° C ou mais, durante no mínimo meia hora, ou se os alimentos contaminados por esta bactéria forem ingeridos crus ou mal cozidos, eles podem provocar uma intoxicação alimentar que é causada por uma toxina produzida pela bactéria (DE CICCIO, 1992).

Estafilococos enterotoxigênicos são representados principalmente pelo *Staphylococcus aureus*, que em sua grande maioria são produtores de coagulase e uma vez presentes no substrato alimentício sintetiza enterotoxinas que quando ingeridas são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar (PEREIRA et al., 2000).

A contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos pode ser feita com dois objetivos diferentes, um está relacionado com a saúde pública (intoxicação alimentar) e outro está relacionado com o controle da qualidade higiênico-sanitária, condição em que *Staphylococcus aureus* indica contaminação. *Staphylococcus aureus*, quando presentes no leite cru, podem representar um risco à saúde dos consumidores pelo fato de algumas cepas de bactérias produzirem enterotoxinas termoresistentes (que resistem à temperatura de 100°C durante 30 minutos) que são capazes de provocar intoxicação alimentar (MELCHÍADES, 1993).

Estima-se que 20% até 60% da população humana possa ser portadora de *Staphylococcus aureus*, sem apresentar qualquer tipo de sintoma. A contaminação de *Staphylococcus sp* de origem animal, que também é uma possível fonte, em

alimentos, apresenta um significado epidemiológico importante, tendo como fonte principal na ocorrência de surtos de doenças veiculadas por alimentos, as mãos e/ou outras superfícies de manipuladores de alimentos que tenham contato com áreas de habitat natural do microrganismo. Assim, o manipulador portador do agente representa um elo na cadeia epidemiológica dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (BRYAN, 1998).



Figura 1. Micrografia eletrônica de varredura de *Staphylococcus*

### 2.1.2 Intoxicação alimentar por *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, apresentando-se na forma de bacilo gram negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo (MURASE et al., 2000). A dose infectante para que bactérias desse gênero possam causar infecção em humanos é da ordem de 15 a 20 células, embora seja preciso considerar a idade e o grau de tolerância do hospedeiro. Acredita-se que em

determinada circunstância uma única célula poderia causar a manifestação clínica da infecção (AHMED et al., 2000).

A contaminação de alimentos por *Salmonella* é muito complexa. Pode ser de origem animal (portadores) e os veículos mais comuns são as carnes de aves, ovos, leite e derivados contaminados ou por meio de equipamentos e superfícies, manipuladores, roedores, insetos ou até mesmo a contaminação cruzada com alimentos de origem vegetal (PICCOLO et al., 1992; BARROS, PAIVA & PANETTA, 2002).

As bactérias do tipo *Salmonella* (Figura 2) contaminam todos os tipos de carne comercializadas, mesmo antes de o animal ser abatido. Quando um animal é contaminado, ele se torna portador e propagador deste microrganismo, que é eliminado juntamente com as fezes, contaminando o solo e a água usados pelo animal, e conseqüentemente afetando outros animais (DE CICCIO, 1992).

Tem sido relatado que algumas espécies de *Salmonella* são capazes de aderir-se firmemente a fibras de colágeno da superfície externa da pele do frango, após a imersão em água, sendo que a adesão não depende de fímbrias, ocorrendo apenas pelo contato da célula microbiana com a pele do frango, no contato com a água. Alguns microrganismos como *Salmonella singapore* e não flageladas como *Salmonella typhimurium*, também têm a capacidade de aderir às carcaças, confirmando dessa maneira que a adesão desses agentes é independente da presença de flagelos (SILVA, 1998).

A incidência de *Salmonella* em queijo é mais freqüente naquele produzido artesanalmente, visto que as normas e os padrões de higiene não são seguidos corretamente.

A ocorrência de *Salmonella* em carne de aves pode ser encarada com naturalidade, uma vez que esses gêneros de microrganismos fazem parte da flora desses animais. A incidência e a quantidade desses microrganismos, presentes na carne, variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais.

As *Salmonellas* são as principais responsáveis pelas toxinfecções alimentares (BOURGEOIS, MESCLE & ZUCCA, 1994). Essa contaminação pode

ocorrer tanto por contato entre aves saudáveis e aves contaminadas como por contaminação cruzada durante o processo de abate e subsequente preparação das carcaças.

No tocante às toxinfecções, cresce a preocupação com a contaminação dos alimentos em geral, e da carne em particular, por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter sp*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* H7:0157, os quais têm sido responsáveis por inúmeros casos de intoxicação e morte, principalmente em países onde o registro de tais ocorrências é levado a sério, conforme a legislação brasileira RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001, que estabelece ausência de *Salmonella sp* em alimentos.



Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de *Salmonella*

### 2.1.3 Intoxicação alimentar por *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (Figura 3) apresenta-se em forma de bastonetes de 1,1 a 1,5 por 2 a 6 micrômetros, móveis por flagelo peritricóicos ou imóveis, não

esporulados, são gram negativas e anaeróbicas facultativas. É encontrada no intestino de mamíferos e só em determinadas situações pode causar infecções. Existem três estirpes diferentes desta espécie, de acordo com a natureza da infecção que podem provocar: estirpes oportunistas, que são em geral inócuas no seu habitat natural, mas podem causar problemas se alcançarem outros locais ou tecido do hospedeiro; estirpes enteropatogênicas, que provocam e afetam a mucosa do tracto intestinal, causando gastroenterites agudas, principalmente em recém-nascidos e crianças até os dois anos; e estirpes enterotoxigênicas, que, embora não tenham capacidade de invadir a mucosa intestinal, produzem enterotoxinas que atuam no nível da membrana das células epiteliais (PINTO, 2005).

*Escherichia coli* O157:H7 tem sido isolado de amostras de fezes de bovino contaminado e também do bovino aparentemente saudável (GRIFFIN & TAUXE, 1991), de rebanhos dos Estados Unidos, Canadá, Inglaterra e Alemanha, sendo que a porcentagem de isolamento foi em torno de 1% em gado saudável e em menor proporção em gado com diarreia.

*Escherichia coli* é um dos microrganismo tido como habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo portanto normalmente encontrado nas fezes destes animais. Muitas cepas de *Escherichia coli* não são patogênicas.

Diversos alimentos de origem animal, principalmente produtos derivados de carne bovina, têm sido considerados veículos de transmissão de *Escherichia coli* O157:H7.

Entre alimentos relacionados como veículo de transmissão estão principalmente a carne moída e o leite não pasteurizado (MARKS & ROBERTS, 1993).

Incidência de *Echerichia coli* em queijo: a reduzida população desses microrganismos indica baixo nível de contaminação fecal, o que pode ser atribuído à qualidade de matéria-prima ou a condições de processamento dos queijos. Por outro lado tem sido relatada a ocorrência de altos níveis de coliformes fecais em queijo coalho, por exemplo.

*Escherichia coli* provoca várias doenças e sua incidência é grande na produção de frangos e galinhas.

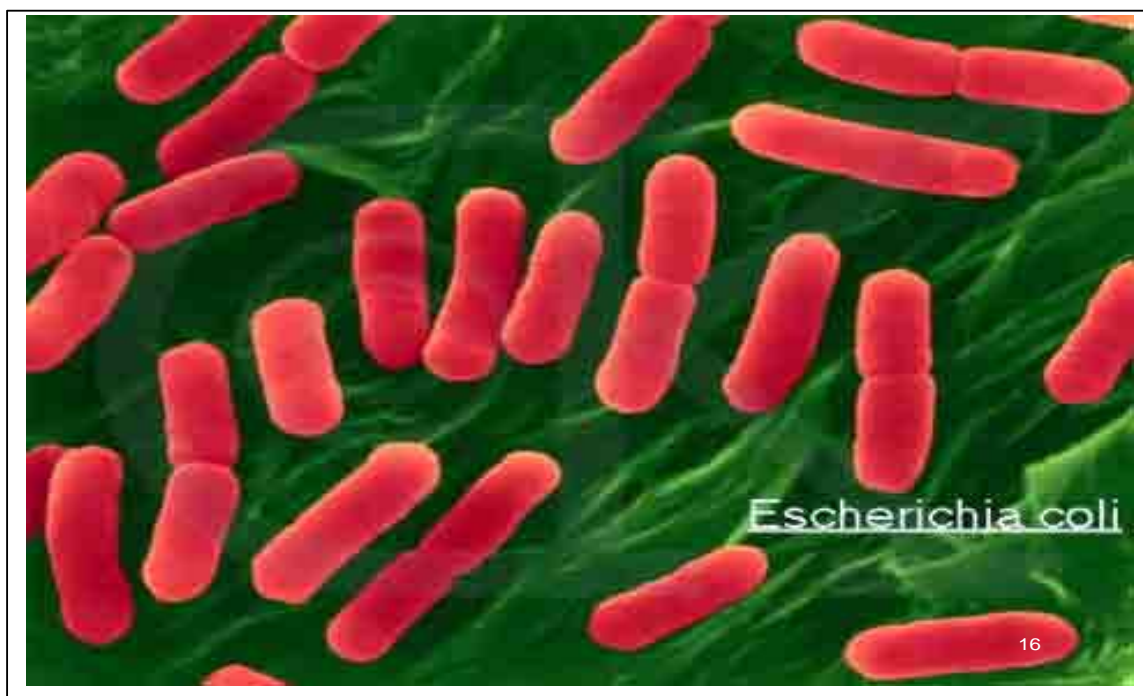


Figura 3. Micrografia eletrônica de varredura de *Escherichia coli*

#### 2.1.4 Intoxicação alimentar por *Clostridium*

*Clostridium sulfito-redutores* são bactérias anaeróbicas mesófilas e pertencentes ao gênero *Clostridium*. A detecção dessas bactérias tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo idéia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, 1997). Sua presença em grande número indica contaminação de matéria-prima. A limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, durante o processamento, são exigidas para a conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995). *Clostridium perfringer* oferece risco durante o cozimento dos alimentos, por se tornar ativa. Esses germes, presentes no ar, na poeira e no chão, disseminados pelas moscas, sobrevivem à fervura durante horas seguidas. Em temperatura abaixo de 20°C ou

acima de 60°C, eles se mantêm inativos, mas entre esses dois limites eles podem se multiplicar rapidamente e causar muitos danos à saúde humana (DE CICCÒ, 1992). Em resumo, *Clostridium* (Figura 4) são espécies bacterianas que produzem esporos altamente resistentes ao calor (endósporos), podendo resistir aos processos normais de cozimento ou de pasteurização, e havendo condições favoráveis ao seu crescimento, podem produzir potentes toxinas nos alimentos (PINTO, 2005).

Há vários meios de cultura disponíveis para a enumeração de *Clostridium perfringer* em alimentos. A seletividade desses meios é resultante da incorporação de um ou mais antibióticos para inibir diversos anaeróbios e anaeróbios facultativos e, salvo no caso dos meios com sangue, a característica diferencial comum a todos os demais é a presença de ferro e sulfeto. Os *clostrídios* reduzem sulfeto a sulfeto, que reage com o ferro e precipita na forma de sulfeto de ferro, produzindo colônias pretas (SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, 1997).



Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura *Clostridium sp*

Os fatores de resistência às drogas antimicrobianas são, na sua grande maioria, de natureza plasmídica. Nos finais da década de 50 e princípio da de 60, autores japoneses revelaram a existência dos plasmídios R. A partir de então, vários outros, como NAKANO, HAMADKA & TERAKADO (1988), detectaram a sua presença nas enterobactérias patogênicas *Salmonella*, *Escherichia coli* e outros microrganismos do homem e animais. Os plasmídios R. são responsáveis pelas resistências adquiridas a diversos antibióticos e quimioterápicos e pelo aparecimento de amostras multiresistentes. O uso indiscriminado desses agentes terapêuticos tem sido um dos grandes responsáveis pela disseminação dos fatores R. Os tratamentos prolongados ou repetidos exercem sobre a microbiota pressões de seleção, originando populações com alto índice de resistências.



### 3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar os coliformes totais e fecais, *Clostridium sulfito-redutor*, *Escherichia coli* O157:H7, *Scherichia aureus*, *Salmonela sp.*

Em amostras de carne moída em processador, temperada com cebola e tomate picados, limão, vinagre, tahine, mix de condimentos e soja; foram analisadas as bactérias: coliformes fecais, *Salmonela sp.*

Em amostra de queijo fresco moído em processador e temperado com salsa desidratada foram analisados: coliformes fecais, *Scherichia aureus*, *Salmonela sp.*

Em amostra de frango pré cozido, desfiado, temperado com soja, molho de tomate, cebola e tomate picados foram analisados coliforme fecais, *Scherichia aureus*, *Salmonela*, *Clostridium sulfito reduto*.

O presente trabalho também teve como objetivos determinar a resistência nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de queijo Minas frescal frente a diferentes antimicrobianos e caracterizar sorologicamente por meio da utilização de antígenos O somáticos das amostras de *Escherichia coli* isoladas.

Os padrões legais são os permitido pelo Ministério da Saúde (Portaria – RDC n<sup>o</sup> 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) (Tabela 1).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras

Foram analisadas amostras dos produtos: carne bovina moída, processada em moedor, temperada com limão, tahine, mix de condimentos, cebola e tomate picados, perfazendo um total de 34 amostras; frango pré cozido, desfiado manualmente, temperado com molho de tomate, perfazendo um total de 25 amostras; queijo Minas frescal moído e processado em moedor, temperado com salsa desidratada, perfazendo um total de 38 amostras.

As matérias-primas foram obtidas de uma indústria de Ribeirão Preto (SP), sendo que as mesmas foram analisadas no período de janeiro a dezembro de 2004.

As amostras coletadas foram acondicionadas em embalagens individuais (sacos plásticos) e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal/SP, sob refrigeração, para realização das análises microbiológicas. O transporte foi feito em caixa de isopor com gelo, em quantidade suficiente para envolver todas as embalagens das amostras. Cada unidade de amostra continha 200g de alimento. Para a realização das análises foi utilizada a metodologia recomendada por SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA (1997). Foram realizadas contagens de bactérias anaeróbicas mesófilas, coliformes totais, coliformes a 45°C, *Staphylococcus sp* e foi também investigada a presença de *Salmonella sp*.

A preparação das amostras para a análise envolveu basicamente duas etapas: a retirada da unidade analítica, que foi feita de forma a garantir que a porção removida representasse todo o conteúdo da unidade da amostra e a preparação de diluições decimais seriadas para inoculação nos meios de cultura.

Toda a matéria-prima utilizada no experimento foi manipulada no interior de câmaras de fluxo laminar, para evitar a contaminação das amostras. Todos instrumentos e utensílios (tesouras, pinças, facas, espátulas, etc.) foram

previamente esterilizados em autoclave ou estufa de esterilização ou mergulhados em etanol 70% e flambados durante o manuseio, e a superfície das bancadas utilizadas foram também higienizadas com etanol 70%.

## **4.2 Isolamento bacteriano e análises de rotina**

### **4.2.1 Pesquisa de *Salmonella sp***

A unidade analítica utilizada nas análises das amostras foi de 25g, retirada assepticamente da amostra e transferida para um frasco contendo 225 mL de caldo lactosado, homogeneizado e incubado a 37°C por 24 horas.

Em seguida, para a análise de *Salmonella sp*, 1 mL da diluição inicial foi transferida diretamente para o caldo de enriquecimento (caldo tetracionato) e incubado a 42°C por 24 horas. A partir desse meio de enriquecimento seletivo foi semeado em placa de ágar xilosisina-desoxicolato e ágar Hektoen (Difco), seguido de incubação a 37°C por 24 horas. A seguir, 3 a 5 colônias suspeitas foram transferidas para ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar lisina ferro (LIA). Os isolados com reações características foram então confirmados com soro anti-*Salmonella* polivalente somático (Probac). Para realização das análises microbiológicas foi utilizada a metodologia recomendada por SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, (1997).

### **4.2.2 Contagem de bactérias anaeróbicas mesófilas**

Para a contagem de bactérias anaeróbicas mesófilas foram realizadas diluições seriadas das amostras em água peptonada, com a diluição inicial de  $10^{-1}$  até  $10^{-3}$ . Em seguida, 1 mL de cada diluição foi colocado em placas de Petri esterilizadas, em duplicata, acrescentando-se a seguir 18 a 20 mL de ágar padrão para contagem (Difco) previamente fundidos e resfriados à temperatura de 44 a 46°C. Foi homogeneizado com movimentos suaves (cerca de 10 vezes) e deixado à temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar e incubado a 37°C por 48 horas, em jarra Gaspak foi realizada a contagem das colônias. Para

realização das análises microbiológicas foi utilizada a metodologia recomendada por SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA (1997). Foram consideradas para a contagem somente as placas da mesma diluição que apresentaram de 30 a 300 colônias, multiplicada a sua média aritmética pelo respectivo fator de diluição, e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias/1,0g de amostra (UFC/g).

#### **4.2.3 Isolamento e identificação de *Escherichia coli* O157:H7**

Foram coletadas assepticamente 25 g de cada amostra analítica e adicionadas a 225 mL de caldo cérebro coração (BHI) homogeneizado e mantido a 35° C por duas horas (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Com o auxílio de uma alça de platina, uma porção foi estriada em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e ágar MacConkey Sorbitol (MCST). As placas foram mantidas a 35° C por 24 horas e após este período de incubação observou-se o desenvolvimento de colônias típicas de *Escherichia coli*. Duas colônias de cada placa foram transferidas para tubos contendo agar tríplice açúcar ferro (TSI). Após essa identificação parcial, as colônias típicas foram selecionadas e a espécie confirmada nas seguintes provas bioquímicas: teste de citrato, teste de indol, teste de malonato, teste VM-VP (vermelho de metila e Voges-Proskauer) (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

#### **4.2.4 Identificação sorológica**

As cepas de *Escherichia coli* sorbitol negativo nas placas de ágar MCST foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro específico (Probac do Brasil) para detecção de *Escherichia coli* O157:H7. As cepas de *Escherichia coli* isoladas também foram testadas sorologicamente para determinação de sua composição antigênica somática "O" (sorogrupo) e, para tal utilizou-se os anti-soros polivalentes e monovalentes da Probac do Brasil. Foram utilizados os anti-soros contra os sorogrupos (EPEC) O26, O55, O111, O119, O114, O125, O142, O158, O86, O126, O127, O128.

Ao ser observada a aglutinação das colônias bacterianas com algum desses antisoros polivalentes, deu-se continuidade à sorotipagem, utilizando-se os antisoros monovalentes correspondentes acima citados.

As colônias que não aglutinaram com os antisoros polivalentes contra EPC foram submetidas ao teste de aglutinação com o antisoro contra o sorotipo de *Escherichia coli* O157:H7, com a afinidade de se detectar EHEC.

As colônias que não aglutinaram nem com os antisoros polivalentes contra EPEC e nem com o antisoro contra o sorotipo O157:H7 e que apresentaram o teste da lisina descarboxilase negativo foram testadas contra os antisoros polivalentes A e B específicos EIEC.

#### **4.2.5 Determinação de coliformes totais e coliformes a 45°C**

Foi utilizada a metodologia do “Número Mais Provável” para realizar a estimativa de coliformes totais e coliformes a 45°C nas amostras dos alimentos.

Materiais requeridos para análise:

- Diluente: 225 ml de água peptonada 0,1 % (H<sub>2</sub>O<sub>p</sub>)
- Tubos de diluição: 3 a 5 com 9,0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>p</sub>/ tubo.
- Pipetas: 3 a 5 pipetas de 1,0 ou 2,0 mL

Para os testes presuntivo foram utilizados:

- Meio de cultura: 9 tubos com 6 - 8 ml de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) ou caldo Lauril Sulfato Triptose suplementado com 50mg/l de 4 – metil-umbeliferil-B-D-glucuronídeo (LST-MUG), com tubos de Durhan.

##### **Contagem de coliforme totais:**

- Meio de cultura: 9 tubos com 6-8 ml de Caldo Verde Brilhante Bile (VB) com tubos de Durhan.

##### **Contagem de coliforme fecais:**

- Meio de cultura: 9 tubos com 6-8 ml de caldo *Escherichia coli* (EC) com tubos de Durhan;
- Cepa padrão positiva: cultura de *Escherichia coli* com 24 horas;
- Cepa padrão negativa: cultura de *Escherichia aerogenes* com 24 horas;

- Banho-maria de temperatura controlada: regulado a 45°C (alimentos em geral).

A metodologia utilizada foi a recomendada pela “Americam Public Health Association”, descrita no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

#### **4.2.6 Contagem de *Staphylococcus sp***

Para a contagem de *Staphylococcus sp* foi semeado 1 mL de cada diluição em três placas de Petri (0,33mL/placa) contendo ágar Baird-Parker (Difco) adicionado de telurito de potássio e gema de ovo e incubado a 37°C por 24 horas. Para a realização das análises microbiológicas foi utilizada a metodologia recomendada por SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA (1997).

#### **4.2.7 Teste de sensibilidade a antimicrobianos**

Um total de 9 cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de queijo Minas frescal foram testadas de acordo com o método de difusão em ágar recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Para a realização desses testes as cepas foram repicadas em tubos contendo 5 mL de caldo tripticase soja e incubadas a 37° C por 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica até a obtenção de turvação idêntica à da solução padrão de cloreto de bário, preparada pela adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico a 1% (v/v) (escala de Macfarland). A seguir, as culturas diluídas foram semeadas, com auxílio de suabes esterilizados, em placas com ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente três minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados discos impregnados com os antibióticos e quimioterápicos abaixo identificados: aztreonam – ATM (30 µg), gentamicina – GEN (10 µg), amicacina - AMI (30 µg), sulfametoxazol-trimetoprima – SZT (25 µg), ceftriaxona – CRO (30 µg), ampicilina – AMP (10 µg), cefalotina – CFL (30µg). A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37° C, pela medida dos halos de inibição, com a utilização de régua

milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetro foram comparados com os da tabela fornecida pelo fabricante (Bristol) dos discos utilizados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das diluições seriadas das amostras de carne, queijo e frango, como citado em Material e Métodos, encontram-se relatados na Tabela 1, na qual pode ser observado que as análises microbiológicas para carne apresentaram ausência de *Salmonella sp* e valores abaixo do padrão permitido para coliformes fecais. Nas amostras de frango observou-se a ausência de *Salmonella sp*. Os agentes *Staphylococcus sp* e *Clostridium* apresentaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Saúde e as amostras de queijo analisadas revelaram a presença de coliformes fecais acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Tabela 1. Padrões e recomendações utilizados para a classificação dos resultados das análises bacteriológicas realizadas no queijo fresco, moído e temperado, carne moída e temperada e frango pré cozido, desfiado e temperado, segundo a resolução RDC n.º 12, de janeiro de 2001.

<b>Amostra/Análise</b>	<b>Padrão Legal (5-E)</b>
<b>Carne</b> Coliformes a 45°C <i>Salmonella sp/g</i>	10 <sup>4</sup> NMP/G Ausência em 25 grs
<b>Amostra/Análise</b>	<b>Padrão Legal (8B-N)</b>
<b>Queijo</b> Coliformes a 45°C <i>Staphylococcus sp/g</i> <i>Salmonella sp/g</i>	10 <sup>2</sup> NMP/G 10 <sup>3</sup> UFC/g Ausência em 25 grs
<b>Amostra/Análise</b>	<b>Padrão Legal (5-J)</b>
<b>Frango</b> Coliformes a 45°C <i>Staphylococcus sp</i> <i>Salmonella sp/g</i> Clostrídios Sulfitos-redutores	10 <sup>3</sup> NMP/G 5x 10 <sup>2</sup> UFC/g Ausente em 25 grs 5x10 <sup>2</sup> UFC/g

Fonte: Agência Nacional da Vigilância sanitária - ANVISA, Resolução RDC n.º 12, de janeiro de 2001.



Na Tabela 2, é demonstrado que 100% das amostras de carne analisadas apresentaram qualidade satisfatória quanto às bactérias: coliformes fecais, *Salmonella sp*, *Staphylococcus sp*. Relatos na literatura de experimentos com outro tipo de material (carne desossada) revelaram a presença de *Salmonella sp* em 77,4% (SMELTZER & RAMSAY, 1981), enquanto que GARCIA-MATAMOROS et al. (1958), utilizando o mesmo tipo de amostra, observaram a presença da mesma bactéria em 100% das amostras.

Também na Tabela 2 pode ser visualizado que, das análises microbiológicas realizadas com as 25 amostras de frango, 100% revelaram-se satisfatórias para as bactérias: coliformes fecais, *Salmonella sp*, *Staphylococcus sp*, *Clostridium sulfitus-redutores*. CARDOSO et al. (2000) obtiveram resultados satisfatórios das 120 amostras congeladas de carcaças de frango, cortes separados de frango (peito, coxa e sobrecoxa) e sub-produtos de frango (lingüiça e salsicha), por meio das análises para pesquisa de coliformes totais, coliformes fecais e *Salmonella*. Neste trabalho, as análises microbiológicas de amostras de frango da bactéria *Staphylococcus sp* estavam dentro dos “padrões higiênicos sanitários”, contrapondo-se aos resultados obtidos por GALETTI & AZEVEDO (2003), que nas provas microbiológicas mostraram que, no processo de produção, tanto do frango xadrez como da alcatra ao molho, algumas amostras apresentaram-se contaminadas, ao menos em uma das três análises, com *Staphylococcus sp*.

No gênero *Salmonella* são agrupadas importantes bactérias causadoras de intoxicações alimentares. A análise de *Salmonella sp* é usada no controle da qualidade dos alimentos, evidenciando contaminação pós-sanitização ou práticas de higiene aquém dos padrões indicados (PARDI et al., 1995; PELCZAR, CHAN & KRIEG, 1996). A contagem de *Staphylococcus sp* é também muito importante nesse tipo de procedimento, porque além de pertencer ao gênero de bactérias patogênicas, sua presença em contagens elevadas indica a falta de higiene na manipulação dos mesmos (FRANCO & LANDGRAF, 1996; BRYAN, 1998).

Na pesquisa qualitativa de *Salmonella sp* (Tabela 2), 100% das amostras de queijo apresentaram ausência deste microrganismo. Este resultado corresponde aos dados encontrados por GONÇALVES & FRANCO (1996), em 30

amostras coletadas em estabelecimentos comerciais de Niterói-RJ. Para *Staphylococcus sp*, 100% das amostras de queijo apresentaram “condições sanitárias satisfatórias”. Os resultados obtidos neste estudo mostram-se superiores aos encontrados por WENDRAP & ROSA (1993), que em 5 amostras coletas em Cuiabá-MT obtiveram 80% das amostras acima do limite. GARCIA-CRUZ, HOFFMANN & VINTURIM (1994), em 11 amostras de queijo comercializadas na cidade de São José do Rio Preto-SP, encontraram 54,5% com valores acima do limite permitido, enquanto ARAÚJO et al. (1998), em 29 amostras obtidas no comércio do Rio de Janeiro – RJ, encontraram 62% das amostras acima do limite. Em 100% das amostras de queijo, carne e frango analisadas neste estudo, não foi constatada a presença de *Staphylococcus sp* e nem *Salmonella sp*. Esses resultados obtidos indicam que as amostras analisadas encontram-se de acordo com os padrões legais estabelecidos na Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Os resultados evidenciam também que em 100% das amostras de frango analisadas, não foi constatada a presença de *Clostrídios sulfito redutores*. Na Tabela 2, pode-se observar que do total de 38 amostras de queijo analisadas, foram encontradas nove (24,0%) com a presença de coliformes fecais acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente e 76% obtiveram resultados satisfatórios. GONÇALVES & FRANCO (1996), trabalhando com 30 amostras de queijo coletadas em estabelecimentos comerciais de Niterói-RJ, obtiveram 93,3% das amostras com contagem acima do limite, e os valores encontrados por PINTO, SOUZA & FANTUZZI (1998) revelaram que 60,6% das amostras estavam acima do limite para coliformes fecais em 33 amostras obtidas no comércio de Viçosa-MG. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que no Brasil observa-se uma grande diversidade de receitas e procedimentos de fabricação de queijo Minas Frescal, os quais variam conforme a região ou estado (OLIVEIRA, 1999). Essas diferenças de parâmetros físico-químicos encontradas nesse tipo de queijo, acredita-se que possa influenciar não só na porcentagem de um determinado tipo de microrganismo, mas também no crescimento de diferentes tipos de agentes patogênicos, neste produto.

Outro fator que deve ser levado em conta é que tem sido amplamente reconhecida a presença de bactérias coliformes fecais nos queijos produzidos a

partir de leite cru (OTTOGALLI, 1986; TAVARES & GARCIA, 1993; GARCIA-CRUZ, HOFFMANN & VINTURIM, 1994; LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). Entretanto, para as amostras analisadas neste estudo, provenientes de leite pasteurizado, as expectativas eram de melhores resultados, pois a pasteurização reduz em 90 a 99% os microrganismos da matéria-prima e, conseqüentemente, reduz a presença de coliformes no queijo fresco (FRAZIER & WESTHOFF, 1993). PEREIRA et al. (1999) citam que a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final.

A matéria-prima, equipamentos, embalagens e manuseio são as principais fontes de contaminação na indústria de queijos (VALLE, 1995). Deve-se levar em conta também que o leite é um produto altamente perecível e um provável veiculador de microrganismos causadores de intoxicações alimentares (RONCADA & CORREIA, 2001). Além disso, sua massa é crua, com alto teor de umidade e não é maturada, devendo ser consumida, no máximo, até quinze dias após sua fabricação, por ser considerado um produto altamente perecível (HOFFMANN, SILVA & VINTURIM, 2002).

Das análises microbiológicas realizadas, pode-se observar que os principais gêneros ou espécies encontrados com maior freqüência nas amostras foram: *Escherichia coli* (44,4%), seguidas por *Klebsiella sp* (22,2%), *Enterobacter sp* (11,1%), *Proteus sp* (11,1%) e *Citrobacter sp* (11,1%). Embora todos esses gêneros sejam de ocorrência comum na matéria fecal, sabe-se que *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* também são constatados em outros ambientes naturais (solo e vegetais), persistindo por períodos maiores neste ambiente (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1985). *Citrobacter sp* e *Proteus sp* são habitantes normais do intestino do homem e dos animais, sendo também encontrados no ambiente e alimentos. As espécies do gênero *Proteus* estão muito difundidas na natureza (água poluída e solo), desempenhando papel essencial nos processos de putrefação e como outros enteropatógenos estão envolvidas em infecções oportunistas extra-intestinais e em casos de diarreia (LÁZARO, RODRIGUES &

MENDONÇA, 1999). Nenhuma das quatro cepas de *Escherichia coli* isoladas, apresentaram aglutinação com os soros polivalentes A, B e C e respectivos monovalentes das espécies EPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica).

Quanto à presença de *Salmonella sp*, apesar da comprovada eficácia da metodologia adotada, não foi possível identificar a presença de *Salmonella sp* em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas das amostras de carne, queijo e frango destinadas à fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto-SP, em 2004.

Microrganismos	Produtos					
	Carne (n=34)		Queijo (n=38)		Frango (n=25)	
	Satisf. (%)	Insatisf.** (%)	Satisf. (%)	Insatisf. (%)	Satisf. (%)	Insatisf. (%)
Coliformes Fecais	100	0	76	24	100	0
<i>S. aureus</i>	ni***	-	100	0	100	0
<i>Salmonella sp</i>	100	0	100	0	100	0
Clostrídios sulfito-redutores	ni***	-	Ni***		100	0

\*Satisfatório

\*\*Insatisfatório

\*\*\*Não Investigado

O número e a porcentagem de bactérias identificadas em nove amostras de queijo estão demonstrados na Tabela 3. As cepas de *Escherichia coli* isoladas dessas amostras foram testadas frente a diferentes antibióticos e quimioterápicos, sendo que pode ser observado que duas linhagens (50,0%) se mostraram resistentes para a associação sulfametoxazol+ trimetoprima, uma cepa (25,0%) para o antibiótico aztreonam e outra (25,0%) para cefalotina e ampicilina. Pela análise desses resultados pode-se verificar que foram bem diferentes aos encontrados por DIAS (1999), que observou 49,6% de resistência de *Escherichia coli* frente à ampicilina.

Tabela 3. Número e porcentagem de enterobactérias isoladas e identificadas em nove amostras de queijo fresco, utilizadas como matéria prima destinadas à fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto-SP, em 2004.

<b>Bactérias</b>	<b>Número de isolamentos</b>	<b>%</b>
<i>E. coli</i>	04	44,4
<i>Klebsiella sp</i>	02	22,2
<i>Enterobacter sp</i>	01	11,1
<i>Proteus sp</i>	01	11,1
<i>Citrobacter sp</i>	01	11,1
<b>TOTAL</b>	<b>09</b>	<b>100,0</b>

LÁZARO et al. (1994), usando a mesma técnica de difusão para testar 94.827 cepas de *Escherichia coli* isoladas de bovinos, ovinos, suínos e aves, relatam a presença de cepas resistentes a antimicrobianos, tais como gentamicina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, amicacina e sulfonamidas, inclusive com a ocorrência de cepas multirresistentes a dois ou mais desses antimicrobianos de importância terapêutica, também encontradas neste trabalho.

A ocorrência de cepas consideradas selvagens, resistentes aos antimicrobianos, é fato preocupante quando observadas as características de patogenicidade da bactéria em questão e quando há a possibilidade de infecções extra-intestinais decorrentes de gastroenterites em grupos mais sensíveis da população, como crianças, idosos, imunossuprimidos e imunocomprometidos (VARNAM & EVANS, 1991).

As bactérias do grupo dos coliformes fecais encontradas em alimentos, resistentes à ação de alguns antibióticos, têm sido observadas quando estes microrganismos são expostos a conservantes ou a desinfetantes como o cloro, podendo se tornar mais resistentes à ação dessas substâncias. O desenvolvimento da resistência tem sido considerado uma via de mão dupla, em que as bactérias resistentes a um tipo de antibiótico também são mais propensas a sobreviver ao uso de conservantes e de outros agentes antimicrobianos. Os desinfetantes e os conservantes são utilizados para combater as bactérias durante o processamento dos alimentos (POTENSKI & MATTHEWS, 2005). De acordo

com POTENSKI & MATTHEWS (2005), a capacidade de sobreviver à ação de certos compostos pode ser decorrente do fato de os três tipos de agentes – desinfetantes, antibióticos e conservantes – afetarem um determinado grupo de genes que permite às bactérias sofrer mutações em resposta à exposição a estas substâncias. Esse grupo de genes é conhecido como operon da resistência múltipla a antibióticos (MAR, na abreviação em inglês). Operon é o nome genérico dado a um conjunto de genes que controla a produção de um único RNA mensageiro, molécula que traduz para a maquinaria das células a receita de fabricação de uma proteína.

Na Figura 5, pode ser observado o perfil de suscetibilidades das cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de queijo. As cepas de *Escherichia coli* sorbitol negativo nas placas de ágar MCST foram submetidas a teste de aglutinação em lâmina com anti-soro específico (Probac do Brasil) para detecção de *Scherichia coli* O157:H7. As cepas de *Escherichia coli* isoladas também foram testadas sorologicamente para determinação de sua composição antigênica somática “O” (sorogrupo) e para tal utilizou-se os anti-soros polivalentes e monovalentes da Probac do Brasil.

A sorotipagem de *Escherichia coli* é de fundamental importância no estudo desta bactéria. As *Escherichia coli* são sorotipadas com base em seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K). Uma combinação específica de antígenos O e H define o sorotipo de uma linhagem, enquanto que a identificação perfunctória, apenas do antígeno O define o sorogrupo desta linhagem (NATARO & KAPER, 1998).

Tem sido demonstrado que a presença dos fatores de virulência está relacionada aos sorotipos e parece ser independente da procedência de cepas isoladas. Observou-se que isolados de humanos e de bovinos pertencentes ao mesmo sorotipo exibem modelos similares de patogenicidade para os genes ehx (enterohemolisina) afã (attaching e effacing) slt (shiga-like toxin), o que garante a possibilidade de transmissão e estabelecimento e colonização de humanos por linhagens de origem bovina (GYLES et al., 1998).

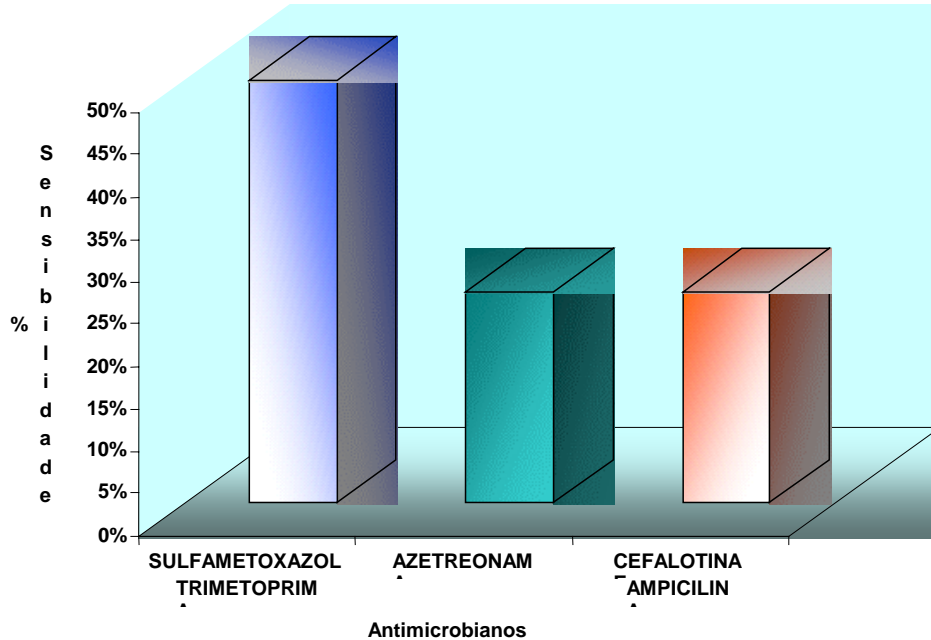


Figura 5. Porcentagem de sensibilidade a antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas de matérias-primas destinadas a alimentos em Ribeirão Preto/SP

As análises realizadas neste trabalho revelaram a ocorrência de falhas no controle da qualidade de queijos produzidos pelo fornecedor desta matéria-prima, confirmando a necessidade de fiscalização sanitária dos setores ligados a produtos de origem animal, para avaliar a qualidade dos produtos por meio da realização de análises laboratoriais.

Os resultados obtidos confirmam que é de extrema necessidade a avaliação constante de amostras de carne, frango e queijo, por meio de análise microbiológica qualitativa e quantitativa, ou seja, por meio de técnicas tradicionais ou técnicas mais sofisticadas como é o caso da PCR (Reação em cadeia da polimerase). Quanto às amostras de queijo, é de grande importância que essa matéria-prima seja processada em condições adequadas de higiene e transporte, bem como armazenada e comercializada de maneira adequada. Não se pode deixar de ressaltar a necessidade de se estar sempre alerta, em informando e conscientizando a população a respeito das DVAs (doenças veiculadas por

alimentos), pois muitas vezes mesmo pessoas bem informadas não conseguem avaliar o quanto estão expostas à contaminação alimentar, causadas principalmente por coliformes fecais.



## 6 CONCLUSÃO

As amostras de queijo analisadas indicam a necessidade de melhorar a qualidade higiênica na indústria de alimentos, seja no manuseio ou no armazenamento desse alimento.

Os demais testes microbiológicos mostram resultados dentro dos padrões higiênicos satisfatórios para o consumo humano.

Das trinta e oito amostras de queijo, nove estavam fora dos padrões microbiológicos e dessas foram isoladas quatro cepas de *Escherichia coli*, duas cepas de *Klebsiella sp*, uma cepa de *Enterobacter sp*, uma cepa de *Proteus sp* e uma cepa de *Citrobacter sp*.

Nenhuma cepa de *Escherichia coli* isolada foi sorotipada com os antígenos testados O26, O55, O111, O119, O114, O125, O142, O158, O86, O126, O127, O128.

As cepas de *Escherichia coli* isoladas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos: sulfametoxazol + trimetoprima (50%), azetreonama (25%) e cefalotina e ampicilina (25%).

## 7 REFERÊNCIAS

AHMED, R. et al. Epidemiolog typing of *Salmonella* enterica serotype enteridis i a Canada – wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2403-2406, 2000.

AQUINO, F. T. M. **Produção de queijo de coalho na Paraíba**: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. 1983. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.

ARAÚJO, V. S. de et al. Análise bacteriológica do queijo Minas Frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: resumo n.º AL – 084, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação - Referências - Elaboração**. NBR 6023. Rio de Janeiro, ago. 2002.

BARROS, V. R. M.; PAIVA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella* sp: sua transmissão através dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 91, p. 15-19, 2002.

BOURGEOIS, C. M.; MESCLE J. F.; ZUCCA, J. **Microbiología alimentaria**. Aspectos microbiológicos. Aspectos microbiológicos de la sanidad y calidad alimentaria. Zaragoza: Acribia, 1994. v. 1, 437 p.

BRASIL. A. **Resolução RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legisl/resol/12-01rdc.htm>>. Acesso em: 6 jan. 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 01, de 28 de janeiro de 1987. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 jan. 1987, p. 2197-2200.

BRYAN, F. L. Risks of practices and processes that lead to outbreaks of food - Borne Diseases. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p. 663-673, 1998.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp, coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, on-line, São Paulo, v. 67, n. 1, jan./jun., 2000. Disponível em: <[http://www.biologico.br/arquivos/v.67\\_1/pesquisa\\_salmonella](http://www.biologico.br/arquivos/v.67_1/pesquisa_salmonella)>. Acesso em: 6 jan. 2003.

CARVALHO, E. P.; MOCHEL, A., C.; LEAL, D. D. M. Qualidade do queijo Minas Frescal comercializado no Rio de Janeiro em feiras livres. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 9., 1996, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 1996. p. 111-118.

DE CICCIO, L. H. S. **Intoxicação alimentar**. Disponível em: <<http://www.saudevidaonline.com.br/artigo:92.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2005.

DIAS, R. S. Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella*: estudo de caso. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 7-11, 1999.

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 2394-2396, 1987.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Ateneu, 1996.

FRANCO, R. M.; ALMEIDA, L. E. F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói-RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 6, n. 21, p. 33-36, 1992.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993.

GALETTI, F. C. S.; AZEVEDO, R. V. P. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária e segurança microbiológica de alimentos, em restaurante tipo "Self Service". **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p. 82, 2003.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L.; VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 78-82, 1994.

GARCIA-MATAMOROS, E. et al. influencia del lavado sobre a qualidade microbiológica de la carne recuperada mecanicamente conservada en refrigeracion. **Revista de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos**, Valência, v. 25, n. 1, p. 125-132, 1958.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. Coliformes Fecais, *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 5-9, jan./abr. 1996.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The Epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterhemorrhagic *E. coli*, and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiologic Reviews**, n. 13, p. 60-98, 1991.

GYLES, C. et al. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-like-toxin-producing *E. coli* of human and bovine origins. **Applied Environment Microbiology**, v. 64. p. 4134-4141, 1998.

HINTON, M.; LINTON, A. H. Field and experimental investigations into the epidemiology of *Salmonella* infections in broiler chickens. In: SMULDERS, F. J. M. **Elimination of pathogenic organisms from meat and poultry**: International Symposium. Prevention of Contamination and Decontamination in the Meat Industry Proceedings. Zeist: Elsevier Science, 1966. p. 27-38.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade Microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Leche y productos lacteos. In: ECOLOGIA Microbiana de los alimentos: produtos alimentícios. Zaragoza: Acribia, 1985. Cap. 18, p. 472-525.

LÁZARO, N. S.; RODRIGUES D. P.; MENDONÇA C. L. *Enterobacteriaceae* oriundas de fontes humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 49-57, 1999.

LÁZARO, N. S. et al. Comportamento de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bovinos frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p.198-201, 1994.

LIMA, E. C.; MENDES, E. S; MENDES, P. P. Pesquisa de coliformes em contagem total de germes em queijo de coalho comercializado no município de Recife. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 9., 1996, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 1996. p. 180-183.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, nov./dez. 2001.

MARKS, S.; ROBERTS, T. *Escherichia coli* O157:H7 Ranks as the Fourth Most Costly Foodborne Disease. **Food Safety**, p. 51-59, set./dez. 1993.

MEAD. G. C. Hygienic problems and control of process contamination. In: MEAD, G. C. **Processing of poultry**. New York: Elsevier. 1989, p. 360-368.

MELCHÍADES, L. E. A. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 48, n. 288, p. 80, 1993.

MURASE, T. et al. Fecal excretion of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* following a foodborne outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3495-3497, 2000.

NASCIMENTO, V. P. et al. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: SIMPÓSIO GOIÂNIA DE AVICULTURA, 2., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: 1996. p. 13-17.

NAKANO, T.; HAMADKA, H.; TERAOKA, N. Drug resistance and R plasmid in the *Salmonella* isolated from calves in 1984-1987. **Jpn. Vet. Med. Ass.**, v. 41, n. 11, p. 806-808, 1988.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinic. Microbiol. Rev.**, n. 11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, 5<sup>th</sup> ed., 2000. 33p.

OLIVEIRA, A. M. **Investigação do comportamento em alimentos de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos**. 1999. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

OTTOGALLI, G. Caratteristiche e Significato della Microflora dei Formaggi. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**. v. 36, p. 207-225, 1986.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: riscos microbiológicos da carne**. Goiânia: UFG, 1995. v. 1, p. 294-308.

PELCZAR JÚNIOR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações: doenças transmitidas por água e alimentos**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, p. 222-236.

PEREIRA, M. L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella sp* em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, 1999.

PEREIRA, M. L. et al. *Estafilococos*: até onde sua importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68/69, p. 32-40, 2000.

PICOLLO, R. C. et al. Surto de *salmonelose* ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 6, n. 23, p. 28-30, 1992.

PINTO, C. L. O.; SOUZA, A. L.; FANTUZZI, M. C. D. Coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijos Minas comercializados no município de Viçosa, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: resumo n.º AL – 084, 1998.

PINTO, F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. Disponível em: <[http://www.ipv.pt/millennium/ect4\\_1.htm](http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm)>. Acesso em: 22 abr. 2005.

POTENSKI, C.; MATTHEWS, K. **Disinfectants, preservatives boost drug resistance rutgers**. University Department of Food Science, New Jersey. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/saude/emdia/2002/05/28/001.htm>>. Disponível em: 22 abr. 2005.

RONCADA, M. J.; CORREIA, M. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 3, 2001.

SILVA, J. A. **Tópicos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. p. 31-32, 41, 53, 65.

SMELTZER T.; RAMSAY R. **Salmonella in mechanically deboned meat**. Aust Vet J. 1981 Sep; 57(9):433-4. R. Publication Types Letter MeSH Terms Australia

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, p. 159, 1995.

TAVARES, L. B. B.; GARCIA, J. A . Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo comercializado no município de Blumenau – SC. **Boletim Ceppa**, Santa Catarina, v. 11, p. 139-146, 1993.

VALLE, J. L. E. Riscos na produção de queijos e princípios de lavagem e desinfecção de equipamentos. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, n. 21, p. 67-68, 1995.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of food** 3. ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 1992. p. 87.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. Foodborne pathogens an illustrated text. **Wolf Publishing**, c. 4, 1991.

WENDRAP, L. L.; ROSA, O. O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas consumido no município de Cuiabá – MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 27 p. 23-29, 1993.