

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/06/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA
OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO
MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU
REFRIGERADO

Laryssa Freitas Ribeiro

Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA
OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO
MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU
REFRIGERADO**

Laryssa Freitas Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral

Coorientadores: Dra. Andressa de Souza Pollo

Dra. Maria Izabel Merino de Medeiros

Dr. Renato Pariz Maluta

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

2016

Ribeiro, Laryssa Freitas
R484c Contaminação por bactérias patogênicas na obtenção de leite e
produção de queijos tipo Minas Frescal elaborados a partir de leite cru
refrigerado / Laryssa Freitas Ribeiro. -- Jaboticabal, 2016
vii, 135 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Luiz Augusto do Amaral

Banca examinadora: Ana Maria Centola Vidal, Manoel Victor
Franco Lemos, Hinig Isa Godoy Vicente, José Moacir Marin
Bibliografia

1. *E. coli*. 2. *Listeria spp.* 3. *Staphylococcus aureus*. 4. MRS. 5.
Saúde pública. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.3:637.1

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESVAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO

AUTORA: LARYSSA FREITAS RIBEIRO

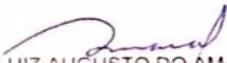
ORIENTADOR: LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

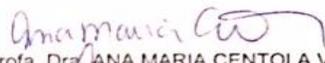
COORDENADOR: RENATO PARIZ MALUTA

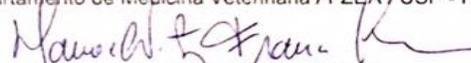
COORDENADORA: MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS

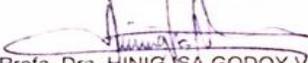
COORDENADORA: ANDRESSA DE SOUZA POLLO

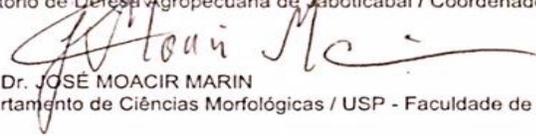
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL
Departamento de Medicina Veterinária / FZEA / USP - Pirassununga/SP


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. HINIGISA GODOY VICENTE
Escritório de Defesa Agropecuária de Jaboticabal / Coordenadoria de Defesa Agropecuária


Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN
Departamento de Ciências Morfológicas / USP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2016

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LARYSSA FREITAS RIBEIRO - Nascida na cidade de Uberaba, Minas Gerais, em 09 de outubro de 1984, filha de João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas. É médica veterinária, formada pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal. Realizou estágio na mesma universidade, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, no Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água, sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, as quais teve duas iniciações científicas com bolsa da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante seu estágio curricular foi para o Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá, sob a supervisão do prof. Dr. John Morris Fairbrother, onde acompanhou e executou atividades, melhorando seu conhecimento teórico e prático. Em agosto de 2011 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da UNESP, câmpus Jaboticabal, também sob a supervisão do Prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, e também com bolsa FAPESP, estagiando mais uma vez no Laboratório de Escherichia coli (EcL) da Universidade de Montreal, na cidade de Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá. Voltou ao Brasil, e finalizou o mestrado em 18 meses. Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado no programa de Medicina Veterinária da UNESP, câmpus Jaboticabal, também sob a supervisão do Prof Dr. Luiz Augusto do Amaral, com bolsa Capes e auxílio Fapesp. Fez doutorado sanduiche no Canadá, à convite de retorno do prof. Dr. John Morris Fairbrother, o qual permaneceu por 10 meses. Retornou ao Brasil em setembro de 2015 dando continuidade à esse programa.

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

Dedico àqueles que mesmo longe estão mais perto que nunca,
Que sonham comigo, e me fazem acreditar, mesmo quando parece impossível,
Porque são em vocês que me inspiro para ser uma pessoa e uma profissional melhor,
Aos meus pais, João Ulisses e Elza,
Com muito amor e muita dedicação,

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus que me deu o dom da vida, muita saúde, oportunidade de me tornar médica veterinária e trabalhar com qualidade de leite e derivados, para o bem da saúde pública. Sou muito feliz e só tenho a agradecer à Ele.

Agradeço aos meus pais, João Ulisses Ribeiro e Elza Aparecida de Freitas pelo amor incondicional em toda minha vida, mas principalmente nesses 10 anos que vivi fora de casa. Não é fácil morar longe de quem se ama. Mas saibam que sem o apoio de vocês eu jamais teria conseguido. Sei que vocês não mediram esforços pra chegarmos até aqui. Vocês são minha força para eu buscar tudo que eu sonho, tudo que eu desejo. E hoje digo com todas as letras, a vitória não é só minha, mas NOSSA. Muito obrigada meus amados pais!

Agradeço também ao meu querido irmão, Ulisses Freitas Ribeiro, minha paixão, meu orgulho, pessoa ao qual eu admiro muito, principalmente pela força de vontade que tem. Eu desde criança quis seguir seus passos e acho que isso é a maior prova da minha admiração. Te amo muito! Obrigada por estar sempre ao meu lado! Agradeço também à minha cunhada, Tatiane Melo, pelo carinho comigo e por entrar na nossa vida e trazer tanta alegria.

Agradeço às minhas segundas mães, dinha Luzia e Vânia Célia, por todo amor e carinho... Vocês estão ao lado dos meus maiores tesouros, minha mãe e meu pai... Amo vocês!

Ao meu avô Chiquinho, que me proporcionou a paixão pelo gado leiteiro, o gado que era manso, que deixava a gente passar a mão... Ele que quando eu era pequena separava a vaquinha para podermos tomar leite "saudável". Lembro de quando tinha apenas sete anos, calcei sua bota na fazenda e saí falando "Hoje eu vou tirar o leite". Meu vizinho é a prova de que "o trabalho enobrece e dignifica o homem". Eu o admiro muito pelo império que construiu em toda sua vida com seu suor, atrás de um carro de boi. Eu quero poder ter metade da força que o senhor teve para atingir meus sonhos...

Às minhas primas, Luana Zago e Luciana Zago, que são como irmãs para mim, minhas confidentes, amigas, que tanto amo! Vocês faziam com que cada ida a Uberaba fossem mais intensas e enchiam meu coração de alegria!

À toda minha família, por todo o amor e carinho sempre! Vocês são a minha base!

Ao meu namorado Henrique Suriani que apareceu de repente na minha vida e me mostra, a cada dia que passa, que as coisas mais simples podem ser as mais especiais e as mais inesquecíveis...

Às amigas Mury (Priscila Arrigucci), Tetxu (Maite del Collado), Selvi's (Letícia Lavezzo), Barraka (Luciana Diniz), Franga (Carolina Nogueira), amizades verdadeiras que levo da Faculdade para sempre comigo... Amo muito!

Às meninas da república "As Coyotes", que foi minha eterna casa, com quem vivi os melhores momentos. Amo vocês meninas!!

Às minhas eternas doutorandas Bel Medeiros, Fernanda Pinto e Mayhara Martins (Gege), com quem aprendi muito do que sei de laboratório, com quem aprendi a ter amor no que faço. Obrigada pelos ensinamentos passados, pela paciência e carinho até hoje comigo! Amo vocês!

Ao pessoal do "Simpósio de qualidade de leite", Chiks (Ana Paula), Guampa (Carol), Kadu (Carlos), Purga (Cecília), Bolinha (Gabriel) Tainá (Henrique), Rabino (Ivan), porque aprendemos muito uns com os outros e juntos somos mais que uma equipe, mas grandes amigos que levo para uma vida. Amo vocês!!

À minha família Canadense Natália Rodrigues, Patrice Simard e às crianças Nicole e Eric, que me acolhem sempre com tanto amor. Me fazem sentir no Brasil quando estou no Canadá e me fazem morrer de saudades quando estou no Brasil. Eu amo vocês!!! Obrigada por todos os momentos que passamos juntos, mesmo a -35°C, em guerra de neve. Vocês foram o melhor presente que o Canadá me deu.

Às meninas do lab, minhas amigas Roberta e Andressa, obrigada por todos os dias de convivência! Pelas brincadeiras, por fazerem com que os dias corridos e tensos fossem mais leves e mais sorridentes. Eu não sei o que seria de mim se não fossem vocês nesses últimos meses... Um muito obrigada em especial à Andressa, minha

também co-orientadora, meu braço direito e esquerdo, que me ensinou tantas coisas nesses últimos tempos. A gente foi se conhecer realmente em 2015, quando cheguei do Canadá e além de co-orientadora, ganhei uma amiga e confidente! Muito obrigada por tudo que fez por mim! Pelos dias até tarde no lab, pelas dúvidas tiradas, pela amizade e por tudo que ainda sei que fará por mim!

Meu amigo Japa, Rafael Akira Sato, meu companheiro de coleta, de lab e de estresse.. Quantas coisas passamos juntos.. Nem sei como te agradecer por tanta coisa. Obrigada por ser meu companheiro desde preparo de meio de cultura, às coletas, laboratório, autoclaves “suja” e por fazer com que todos os produtores de leite amassem a gente!

À Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Júnior (Diba), pela amizade, conselhos e companheirismo. Saibam que tenho um carinho enorme por vocês!

Aos meu co-orientadores Andressa de Souza Pollo, Maria Izabel Merino de Medeiros e Renato Pariz Maluta, aos ensinamento dados!

To Dr. John Morris Fairbrother, my canadian professor and my friend for the incredible opportunity to stay at University of Montreal (UdeM), one of the top universities worldwide. Thank you for believing me and become myself a better researcher.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, pelos 9 anos de orientação. Lembro como se fosse hoje quando o procurei para uma iniciação, no meu segundo ano de faculdade, e fui recebida de braços abertos pelo senhor, que nem me conhecia direito. A confiança foi crescendo e aqui estamos. São 9 anos de orientação de professor para aluna e também de pai para filha. Quantas vezes entrei na sua sala pedindo conselhos e no mesmo número de vezes, o senhor pacientemente conversou comigo. Obrigada por todos esses anos. Hoje tenho certeza que sou não só uma profissional e pesquisadora melhor mas também uma pessoa melhor graças ao senhor, esse ser iluminado. Esse título não é só meu, mas NOSSO. Muito obrigada por tudo o que o senhor fez por mim. Por apoiar e acreditar nos meus sonhos loucos, como o de querer ir para o exterior e de querer comprar nanodrop para nosso lab. Esses sonhos só existiram porque o senhor acreditava em mim. Eu espero, um dia, fazer

metade à saúde pública e aos produtores rurais de leite, que o senhor já fez. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência e me desculpe pelas minhas falhas.

À professora Dra. Ana Maria Centola Vidal, professora a qual eu admiro muito pelos ensinamentos que me passa sobre a qualidade de leite e derivados e também pelo pessoa que é. Obrigada pela amizade!

À banca examinadora prof Dra. Ana Maria Centola Vidal, prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, Dra. Hinig Isa Godoy Vicente, prof. Dr. José Moacir Marin pela disponibilidade de participar e pelas contribuições dadas à esta tese e aos artigos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal que participaram desta minha trajetória, os quais guardo um enorme carinho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade do curso de pós-graduação.

À Capes pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Leite e a produção de queijo Minas frescal.....	3
2.2. Bactérias Gram-negativas veiculadas por leite e derivados.....	6
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	6
2.3. Bactérias Gram-positivos veiculadas por leite e derivados.....	10
2.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.3.2. <i>Staphylococcus</i> spp.	12
2.3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.2.2. <i>Staphylococcus</i> resistentes à meticilina (MRS).....	15
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> DETECTADOS EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO.....	30
RESUMO.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
2.1. Coleta das amostras.....	32
2.2. Preparo das amostras para isolamento de <i>E. coli</i>	38
2.3. Obtenção das coleções de <i>Escherichia coli</i>	39

2.3.1. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> comensais.....	41
2.3.2. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> potencialmente patogênicos.....	41
2.3.3. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> resistentes à Ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL).....	45
2.4. Agrupamento filogenético.....	46
2.5. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência	48
2.6. Análise epidemiológica dos isolados de <i>E. coli</i> por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	50
2.7. Análise molecular para identificação de genes de resistência por PCR.....	51
2.8. Sorologia para detecção do antígeno somático (O).....	54
2.9. Multilocus Sequence Typing (MLST)	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1. Isolamento de <i>E. coli</i> nos diferentes pontos da obtenção do leite e produção do queijo tipo Minas frescal e análises genotípicas.....	57
3.1.1. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> comensais.....	57
3.1.2. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> potencialmente patogênicos.....	58
3.1.3. Coleção de isolados de <i>E. coli</i> resistentes à ceftriaxona ou extended-spectrum b-lactamase (ESBL).....	63
3.2. Agrupamento filogenético.....	64
3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos para tipagem de resistência	68
3.4. Análise epidemiológica dos isolados de <i>E. coli</i> por gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	71
3.5. Identificação de genes de resistência por PCR.....	77
3.6. Sorologia para detecção do antígeno somático (O).....	81
3.7. Multilocus Sequence Typing (MLST)	83
4. CONCLUSÕES.....	86
5. REFERÊNCIAS.....	86

CAPÍTULO 3 – GRAM-POSITIVOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO.....	95
RESUMO.....	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
2.1. Coleta das amostras.....	97
2.2. Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e identificação de espécies e genes de virulência.....	97
2.3. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e detecção dos genes de enteroxinas.....	100
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
3.1. Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e identificação de espécies e genes de virulência.....	104
3.2. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e detecção dos genes de enteroxinas.....	107
4. CONCLUSÕES.....	110
5. REFERÊNCIAS.....	111
CAPÍTULO 4 – PREVALÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus</i> spp. RESISTENTES À METICILINA DETECTADOS EM DIFERENTES PONTOS DA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO...	115
RESUMO.....	115
1. INTRODUÇÃO.....	116
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	117
2.1. Coleta das amostras.....	117

2.2. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à meticilina (MRS) na obtenção do leite e na produção de queijos tipo Minas Frescal.....	117
2.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS.....	119
2.4. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD.....	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
3.1. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à meticilina (MRS) nos diferentes pontos da obtenção do leite e da produção do queijo tipo Minas frescal.....	124
3.2. Teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados MRS.....	125
3.3. Sequenciamento dos isolados MRS e RAPD.....	127
4. CONCLUSÕES.....	130
5. REFERÊNCIAS.....	130
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134

CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA OBTENÇÃO DE LEITE E PRODUÇÃO DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL ELABORADOS A PARTIR DE LEITE CRU REFRIGERADO

RESUMO - A produção de queijos elaborados a partir de leite cru refrigerado no Brasil ainda é alta, embora esta prática não seja autorizada em algumas regiões do país, como no estado de São Paulo. Assim, a fim de dimensionar os riscos de veiculação bacteriana em tal tipo de alimento e identificar suas fontes de contaminação, este estudo objetivou detectar a presença de bactérias patogênicas em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal. Amostras de suabes de fezes bovinas, mãos de ordenhador, balde de ordenha, leite, soro, água, superfície de elaboração de queijos, mãos de manipulador do queijo, peneiras, bandejas, fôrmas e escumadeiras foram coletadas em cinco propriedades onde os queijos são elaborados a partir de leite cru na região de Jaboticabal, nordeste do Estado de São Paulo. Foram pesquisadas *E. coli* potencialmente patogênicas e bactérias do gênero *Listeria spp.* e *Staphylococcus*, incluindo aqueles resistentes à meticilina (MRS). Os isolados de *E. coli* foram separados em três coleções, de patogênicas, comensais e resistentes à ceftriaxona (ESBL). Encontrou-se importantes isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos, como STEC e ExPEC, inclusive em amostras de leite e queijo. Os isolados de *E. coli* foram pertencentes, em sua maioria, aos grupos filogenéticos A e B1. O sorogrupo mais encontrado foi o O18 e, segundo o MLST, obteve-se isolados ST131, características relacionadas a estirpes potencialmente patogênicas. Tais isolados apresentaram resistência antimicrobiana principalmente ao ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, estreptomicina, sulfisoxazole e tetraciclina. A análise de similaridade genética por PFGE indicou que isolados de *E. coli* da mesma propriedade, contendo o mesmo gene de virulência, circularam em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos tipo Minas frescal. O gênero *Listeria spp.* teve uma alta prevalência nas amostras, no entanto, não foram identificadas as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii*. *S. aureus* foi encontrado em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção dos queijos, principalmente em amostras de queijo, em todas propriedades. Tais isolados eram, inclusive, portadores de diferentes genes codificadores de enterotoxinas. Isolados MRS foram obtidos em queijos e mãos de manipuladores de queijos e mostraram-se resistentes à oxacilina, penicilina e cefepime. Tais isolados foram identificados como *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. epidermidis* pelo sequenciamento gênico e, segundo o RAPD, houve similaridade genética entre isolados das mãos dos manipuladores e queijos. Assim, conclui-se que a elaboração de queijos a partir de leite cru está associada a más condições higiênicas e que microrganismos com potencial risco à saúde pública podem chegar no produto final, o queijo.

Palavras-chaves: *E. coli*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus*, MRS, saúde pública

CONTAMINATION BY PATHOGENIC BACTERIA IN MILK OBTENTION AND PRODUCTION OF MINAS FRESCAL CHEESE PREPARED FROM REFRIGERATED RAW MILK

ABSTRACT – Cheese production made from refrigerated raw milk in Brazil is still high although this practice is not allowed in some regions of the country as in São Paulo state. Thus, in order to assess bacterial infection risks in this type of food and to identify sources of contamination this study aimed to detect the presence of pathogenic bacteria in different points of milk production and the production of Minas Frescal cheeses. Samples of faeces swabs, milker hands, milking pails, milk, water, cheese elaboration surface, cheese manipulator hands, sieves, trays, molds and skimmers were collected in five properties where the cheeses are made from raw milk in the region of Jaboticabal, northeast of São Paulo State. We investigated potentially pathogenic *E. coli*, *Listeria* spp. and *Staphylococcus* spp., including those resistant to methicillin (MRS). *E. coli* isolates were separated into three collections, pathogenic, commensal and resistant to ceftriaxone (ESBL). Significant pathogenic *E. coli* isolates such as STEC and ExPEC were found in milk and cheese samples. *E. coli* isolates belonged mostly to phylogenetic groups A and B1. The most commonly serogroup found was O18 and according to the MLST, isolates ST131 were obtained and they are related to potentially pathogenic strains. These isolates presented antimicrobial resistance mainly to nalidixic acid, ampiciline, kanamycin, streptomycin, sulfisoxazole and tetracycline. The genetic similarity analysis by PFGE indicated that *E. coli* isolates from the same property containing the same virulence gene were circulating at different points of milk production and in the production of Minas Frescal cheeses. The genus *Listeria* spp. had a high prevalence in the samples, however, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* and *L. ivanovii* species were not identified. *S. aureus* was found at different points of milk production and cheeses production, mainly in cheese samples in all properties. Such isolates were also carrying different enterotoxin-encoding genes. MRS isolates were obtained in cheeses and cheese manipulator hands and were resistant to oxacillin, penicillin and cefepime. These isolates were identified as *S. haemolyticus*, *S. hominis* and *S. epidermidis* by gene sequencing and according to RAPD there was genetic similarity between isolates from the hands of the manipulators and cheeses. Thus, it can be concluded that the preparation of cheeses from raw milk is carried out under poor hygienic conditions and that microorganisms with a potential public health risk can reach the final product, cheese.

Keywords: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, MRS, public health

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O setor de produção de leite exerce enorme importância econômica e social por ser um gerador de empregos. Mesmo as pequenas propriedades rurais, muitas vezes familiares, possuem grande relevância social tanto pelo número de famílias envolvidas quanto pelo volume de leite produzido. Muitos agricultores sobrevivem integralmente da renda gerada pela atividade leiteira (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006) e, para complementar esta renda, investem na produção clandestina de queijos, elaborados a partir de leite cru. A produção destes queijos geralmente é tradicional, passado de geração em geração em muitas regiões brasileiras. E esta diferencia-se da produção industrial pela não utilização de processos mecanizados e pela ausência de pasteurização do leite (EMBRAPA, 2011).

O queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru possui alto valor nutritivo, proteínas, matéria graxa, cálcio e fósforo (ALAIS, 2003). No entanto, por ser um alimento cru, em determinadas condições, este queijo pode veicular uma série de bactérias patogênicas, tais como aquelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A presença de tais bactérias pode indicar contaminação fecal e falta de higiene na elaboração do queijo (HOFFMANN et al., 2004).

Em geral, a presença de microrganismos patogênicos em alimentos deve ser avaliada a fim de se conhecer as condições higiênico-sanitárias da sua produção e, conseqüentemente, da sua qualidade (CARDOSO; ARAÚJO, 2004). Além da contaminação microbiológica, a ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode selecionar microrganismos resistentes que também podem ser utilizados no tratamento de enfermidades infecciosas em seres humanos (MANTILLA et al., 2008; RAPINI et al., 2004). Já foi comprovado que alimentos de origem animal servem como veículo de patógenos resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções em humanos (BARBOSA; JORGE; UENO; 2007).

O queijo tipo Minas frescal elaborado a partir de leite cru faz parte da cultura brasileira, não somente do estado de Minas Gerais, como também de outras regiões

do País. Neste contexto, a região de Jaboticabal, no estado de São Paulo, possui várias propriedades que produzem esse tipo de queijo que é comercializado nas próprias propriedades, em supermercados, varejões ou por vendedores ambulantes, tratando-se, assim, de uma economia significativa.

Dada a importância social, cultural e econômica dos queijos elaborados a partir de leite cru e do alto risco de veiculação de microrganismos que tal alimento possui, muitos resultados de pesquisas foram publicados nos últimos anos (GAULIN et al., 2012; VAN CAUTEREN et al., 2009; DOMINGUEZ et al., 2009). Entretanto, grande parte dos estudos visam a identificação de microrganismos por técnicas de microbiologia clássica e testes bioquímicos, os quais podem falhar na identificação acurada de espécies microbianas. Dessa forma, estudos moleculares fazem-se imprescindíveis para a correta identificação de espécies bacterianas e suas relações genéticas. Assim, a fim de dimensionar os riscos de veiculação bacteriana em tal tipo de alimento e identificar suas fontes de contaminação, este estudo objetivou detectar a presença de bactérias patogênicas em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal em cinco propriedades na região de Jaboticabal, São Paulo.

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa detectou *E. coli* potencialmente patogênica e resistentes a antimicrobianos, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS) em diferentes pontos da obtenção do leite e da produção de queijos tipo Minas frescal nas cinco propriedades amostradas na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Tais contaminações podem estar diretamente associadas às más condições higiênicas sanitárias encontradas nos locais como, não limpeza dos tetos das vacas antes das ordenhas, mesmo quando havia água disponível na sala de ordenha, não realização de teste da caneca de fundo preto e CMT, sujidade de fezes bovinas no ambiente de ordenha, resquícios de leite de ordenhas anteriores nos utensílios e falta de higiene no preparo dos queijos, entre outros. A presença de *S. aureus* em amostras de leite e no produto final pode estar diretamente relacionada à alta percentagem de animais com mastite clínica nas propriedades, observada pela presença de grumos no descarte dos primeiros jatos de leite dos animais. A obtenção de isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos pode estar relacionada ao uso abusivo e/ou inadequado destes medicamentos nas propriedades.

Do ponto de vista da saúde pública, é importante e necessária uma campanha de educação e saúde dirigida aos produtores para conscientização sobre o uso adequado de antimicrobianos e suas consequências, e sobre higiene no processo de obtenção do leite e queijo. O emprego de cuidados tais como limpeza da sala de ordenha, limpeza dos tetos, “pré-dipping”, “pós-dipping” e também testes para mastite clínica como teste da caneca de fundo preto, é imprescindível. Antes, durante e após a produção dos queijos é essencial a limpeza profunda dos utensílios. A utilização de termômetros para mensuração da temperatura do leite e a higiene, principalmente da lavagem correta das mãos, são medidas importantes na produção de queijos tipo Minas frescal, afim de se evitar contaminações entre humanos e alimento. Ademais, deve-se haver controle rigoroso da qualidade microbiológica da água destas propriedades.

A população deve ser conscientizada do risco do consumo do leite cru refrigerado e de queijo tipo Minas frescal produzidos clandestinamente. Tais produtos

não são fiscalizados e podem veicular bactérias patogênicas e resistentes a antimicrobianos que podem ocasionar problemas sérios à saúde humana, podendo colocar em risco a saúde do consumidor. Esta conscientização pode ser iniciada em escolas, por exemplo, para as crianças, que conseqüentemente levarão para os pais.

Além disso, a implantação de fiscalização nas propriedades produtoras de leite e queijo é imprescindível para evitar problemas de saúde pública.