

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**LEITE IN NATURA E QUEIJOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS
EM CRUZ DAS ALMAS – BAHIA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

GLEYDE CÓRDOVA DA FRANÇA SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
JULHO - 2011**

**LEITE IN NATURA E QUEIJOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS
EM CRUZ DAS ALMAS – BAHIA: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

GLEYDE CÓRDOVA DA FRANÇA SANTOS

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2008

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto

Co-Orientadora: Dr^a. Márcia Luciana Cazetta

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

JULHO - 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S237	<p>Santos, Gleyde Córdova da França Leite in natura e queijos artesanais comercializados em Cruz das Almas – Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana/ Gleyde Córdova da França Santos._ Cruz das Almas - BA, 2011. 95 f.; il.</p> <p>Orientadora: Norma Suely Evangelista Barreto Co-Orientadora: Márcia Luciana Cazetta</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1. Laticínios - Microbiologia. 2. Laticínios – Qualidade. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 637.1</p>
------	--

Ficha catalográfica elaborada pela seção técnica da biblioteca central da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Cruz das Almas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
GLEYDE CÓRDOVA DA FRANÇA SANTOS**



Prof^ª. Dr^ª. Norma Suely Evangelista Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientadora)



Dr^ª. Eliseth de Souza Viana
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical - CNPMF



Prof^ª. Dr^ª. Ryzia de Cássia Vieira Cardoso
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Dissertação homologada pelo colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia
Agrícola em _____

Conferindo o Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____

*A Deus, por me proteger e fortalecer,
em todos os momentos dessa jornada.
A minha filha Tainá, minha maior alegria,
meu maior feito e minha maior razão de ser.
Aos meus pais Álvaro Córdova e Dalva França,
pelo amor e dedicação durante toda minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que através do seu amor e bondade tornou possível a realização de mais um sonho, fortalecendo meu interior, dando-me coragem para alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares por toda ajuda, apoio e amor, imprescindíveis nessa caminhada, em especial minha filha Tainá, meus pais Álvaro e Dalva, a Géu (segunda mãe), meus irmãos Dálvaro, Dayse e Sophia Clara, além dos mais queridos tios e primos.

A Rogério Silveira pelo amor e paciência, apoio e incentivo, me encorajando a seguir sempre em frente.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de realização desse curso, por meio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pela concessão da bolsa durante o mestrado.

À Professora Dr^a. Norma Suely Evangelista Barreto, minha orientadora, pelos ensinamentos, dedicação e, principalmente, pela sua obstinada missão de mestre, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos, acrescentando valores indispensáveis à minha formação acadêmica.

À Professora Dr^a. Márcia Luciana Cazetta pela paciência e solidariedade em ajudar os alunos sempre que possível.

Às amigas e companheiras de jornada acadêmica Ana Cláudia Santos e Priscila Miranda, que comprovaram que estar ao lado de amigos numa conquista, torna tudo mais fácil.

Às demais e especiais amigas Vanine França, Eliene Lima, Raysa Conceição e Patrícia Nascimento pela força e incentivo constantes.

Aos colegas do NEPA, especialmente “meus” estagiários, Aura Crepaldi, Rebeca Silva e Jeferson Souza, por trilhar esse caminho ao meu lado, com dedicação e apoio inegáveis e incomparáveis, tornando a execução desse trabalho ainda mais prazerosa.

A Ricardo Bastos pela contribuição nas análises estatísticas.

À funcionária Rejane Cardoso pela amizade e ajuda constante.

Aos mestres do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem às impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
CAPÍTULO 1	
Leite in natura e queijo artesanal: aspectos microbiológicos	03
1. Leite in natura	06
2. Queijo de coalho e requeijão do norte	07
3. Saúde pública	10
4. Micro-organismos indicadores de qualidade	12
5. Antimicrobianos	22
6. Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 2	
Qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana do leite in natura comercializado em Cruz das Almas – Bahia	34
Introdução	39
Material e Métodos	40
Resultados e Discussão	45
Considerações Finais	55
Referências Bibliográficas	55
CAPÍTULO 3	
Queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas - Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana	60

Introdução	63
Material e Métodos	64
Resultados e Discussão	69
Conclusões	78
Referências Bibliográficas	78

RESUMO

Santos, G.C.F. Leite in natura e queijos artesanais comercializados em Cruz das Almas – Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a qualidade microbiológica do leite in natura, queijo de coalho e requeijão do norte comercializados no município de Cruz das Almas, Bahia, visando conhecer as condições higiênico-sanitárias, bem como verificar a susceptibilidade à antimicrobianos das estirpes isoladas destes produtos. Foram colhidas 25 amostras de leite, 10 de queijo de coalho e 14 de requeijão do norte e quantificados micro-organismos mesófilos e psicotróficos (leite), bolores e leveduras, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 35°C e 45°C e presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. No leite in natura foi isolado *Staphylococcus* coagulase positiva em 44% das amostras, com contagem média de $7,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, mesófilos $1,6 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, psicotróficos $9,6 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, bolores e leveduras $3,8 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, coliformes a 35°C $4,0 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹ e a 45°C $3,8 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹. *Escherichia coli* foi isolada em 76% das amostras, não sendo observada a presença de *Salmonella*. *Escherichia coli* apresentou resistência a tetraciclina (57,9%), ampicilina e cloranfenicol (10,5%) e cefalotina (5,3%), enquanto *Staphylococcus* coagulase positivo foi resistente a amicacina (18%) e vancomicina (18%). Para os queijos de coalho e requeijão do norte, respectivamente, *Staphylococcus* coagulase positiva foi isolado em 80 e 7% das amostras, com média de $1,5 \times 10^6$ e $8,3 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, micro-organismos mesófilos $1,9 \times 10^9$ e $2,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹, bolores e leveduras $3,1 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, coliformes a 35°C $1,1 \times 10^6$ e $4,4 \times 10^4$ NMP.g⁻¹ e a 45°C $1,1 \times 10^5$ e $9,5 \times 10^2$ NMP.g⁻¹. *Escherichia coli* foi isolada em 50% das amostras de queijo de coalho e em 7% das amostras de requeijão do norte, não sendo observada a presença de *Salmonella*. *Escherichia coli* apresentou resistência de 16,7% a ampicilina e 16,7% ao imipenem, enquanto *Staphylococcus* coagulase positivo se mostrou resistente a nitrofurantoína (55,6%), tetraciclina (88,9%) e vancomicina

(77,7%). Assim, tanto o leite quanto os queijos analisados, além de apresentarem qualidade microbiológica insatisfatória, podem servir de veículo de transmissão de bactérias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, antimicrobianos, segurança alimentar.

ABSTRACT

Santos, G.C.F. Fresh milk and artisan cheeses sold in Cruz das Almas – Bahia: microbiological quality and antimicrobial susceptibility.

The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of fresh milk, cheese curd and northern cheese sold in the city of Cruz das Almas, Bahia, to determine the sanitary conditions, and to verify the antimicrobial susceptibility of these isolates products. We collected 25 samples of milk, 10 cheese curds and 14 of northern cheese and quantified micro-organisms mesophilic and psychrotrophic (milk), molds and yeasts, *Staphylococcus* spp. *Staphylococcus* coagulase positive, coliforms at 35°C and 45°C and the presence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. In fresh milk was isolated *Staphylococcus* coagulase positive in 44% of the samples, with average count of 7.3×10^5 UFC.mL⁻¹, mesophilic 1.6×10^9 UFC.mL⁻¹, psychrotrophic 9.6×10^4 UFC.mL⁻¹, yeast and mold 3.8×10^8 UFC.mL⁻¹, coliforms at 35°C 4.0×10^5 NMP.mL⁻¹ and 45°C 3.8×10^5 NMP.mL⁻¹. *Escherichia coli* was isolated in 76% of the samples, not revealing the presence of *Salmonella*. *Escherichia coli* was resistant to tetracycline (57.9%), ampicillin and chloramphenicol (10.5%) and cephalothin (5.3%), whereas *Staphylococcus* coagulase positive was resistant to amikacin (18%) and vancomycin (18%). Rennet for cheese curd and northern cheese, respectively, *Staphylococcus* coagulase positive was isolated in 80 and 7% of the samples, with an average of 1.5×10^6 and 8.3×10^3 UFC.g⁻¹, a mesophilic micro-organisms 9×10^9 and 2.6×10^8 UFC.g⁻¹, molds and yeasts 3.1×10^5 and 3.0×10^5 UFC.g⁻¹, coliforms at 35°C 1.1×10^6 and 4.4×10^4 NMP.g⁻¹ and 45°C 1.1×10^5 and 9.5×10^2 NMP.g⁻¹. *Escherichia coli* was isolated in 50% of the samples of cheese curds and 7% of the samples of northern cheese, not revealing the presence of *Salmonella*. *Escherichia coli* was resistant to ampicillin, 16.7% and 16.7% to imipenem, while *Staphylococcus* coagulase positive proved resistant to nitrofurantoin (55.6%), tetracycline (88.9%) and vancomycin (77.7%). Thus, both the milk and the cheeses analyzed, and presented poor microbiological quality can serve as a vehicle of transmission of resistant bacteria to different antimicrobial agents.

Keywords: *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positive, antimicrobial, food security.

INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica encontrada no leite in natura produzido no Brasil é reflexo das precárias condições de higiene típicas da produção nacional. Embora sejam importantes para a economia do país, as fazendas leiteiras ainda apresentam pouco ou nenhum conhecimento tecnológico, com condições higiênicas insatisfatórias e controle sanitário ineficiente (ARCURI et al., 2006; NERO et al., 2009). Além disso, grande parte dessa produção é comercializada informalmente, sendo que aproximadamente 40% dela não sofre nenhum tipo de fiscalização oficial (EMBRAPA, 2008; NERO et al., 2008). O comércio informal é uma realidade em diversas regiões do país, representando risco microbiológico aos consumidores devido à possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos.

Os queijos artesanais, também são amplamente consumidos, apesar de serem elaborados em condições insatisfatórias de higiene, sem apresentar padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, além do Ministério da Saúde (FEITOSA et al., 2003; MORAIS et al., 2009). Seu consumo é motivado por hábitos alimentares antigos, já que parte da população consumidora acredita que esses produtos sejam mais saudáveis, além de possuir preço mais acessível (ARIMI et al., 2005).

Em consequência das deficiências durante a obtenção e elaboração desses produtos, verificam-se altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, como as bactérias aeróbias mesófilas e os coliformes (FEITOSA et al., 2003; NERO et al., 2009). Vários trabalhos têm demonstrado a importância do leite in natura e seus derivados como potenciais veiculadores de agentes patogênicos associados aos alimentos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus* e *Campylobacter jejuni* (ARIMI et al., 2005; VANEGAS et al., 2009).

Alimentos contaminados representam um risco aos consumidores, principalmente indivíduos imunodeprimidos, idosos e crianças. Devido a isso, o desenvolvimento de pesquisas e programas de segurança de alimentos vem sendo estimuladas (CALLAWAY et al., 2006). Em muitos casos, as enfermidades não são diagnosticadas devido à baixa notificação de surtos, pela falta de

amostragens dos alimentos contaminados envolvidos ou mesmo pelas limitações e lentidão das metodologias analíticas usualmente empregadas no diagnóstico (CREMONESI et al., 2007).

Além dos aspectos relacionados à precariedade da produção leiteira e fabricação de queijos artesanais, outro sério problema que chama a atenção da comunidade científica é o aumento de bactérias patogênicas isoladas de alimentos que apresentam resistência aos antibióticos, especialmente os utilizados na produção animal (RAPINI et al., 2003; GÜLER, et al., 2005; RABELLO, et al., 2005). Uma grande variedade de substâncias com atividade antimicrobiana é usada em sistemas de produção animal na profilaxia, na terapia e como promotores de crescimento. As substâncias usadas com fins profiláticos ou terapêuticos em veterinária pertencem à mesma classe dos antibióticos utilizados na medicina humana (SCHWARZ E CHASLUS-DANCLA, 2001).

Desde a sua introdução, houve um aumento da prevalência da resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas e comensais, no homem e animais. O rápido aparecimento de estipes resistentes após a introdução de um novo antibiótico na medicina demonstra a extrema capacidade de adaptação das bactérias às alterações do meio. Na realidade, os micro-organismos devem a sua existência à capacidade de se adaptarem às mudanças. Uma grave consequência desta capacidade é, sem dúvida, o desenvolvimento da resistência (MARTEL et al., 2001). Apesar de haver um intervalo de segurança, legalmente estabelecido até que o animal seja abatido, o não cumprimento desse tempo, fará com que haja resíduos do antibiótico no alimento, podendo assim ser transferido aos consumidores (BOISSEAU, 1993; CORPET, 1993; DAYAN, 1993).

Assim, o objetivo desse estudo foi analisar a qualidade microbiológica do leite in natura, queijo de coalho e requeijão do norte comercializados no município de Cruz das Almas, Bahia, no sentido de verificar as condições higiênico-sanitárias dos produtos, além de verificar a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas.

CAPÍTULO 1

Leite in natura e queijo artesanal: aspectos microbiológicos

RESUMO

Santos, G.C.F. Leite in natura e queijo artesanal: aspectos microbiológicos.

Foi realizada uma revisão sobre os aspectos gerais do leite in natura, queijo de coalho e requeijão do norte, destacando-se as falhas ocorridas na cadeia produtiva até o consumidor, relacionada aos aspectos higienico-sanitários. Somado a isso, foram abordados os limites microbiológicos preconizados pela legislação para esses produtos. Em seguida, foram descritos aspectos da saúde pública relacionados às Doenças Transmissíveis pelos Alimentos, além dos principais agentes patogênicos associados ao leite e queijo artesanal. Mencionou-se também a falta de dados epidemiológicos relacionados à surtos causados por bactérias de origem alimentar bem como a falta de fiscalização durante a produção e o controle de qualidade. Foram caracterizados os seguintes grupos de micro-organismos: bactérias heterotróficas mesófilas e psicrotólicas aeróbias, bolores e leveduras, o grupo dos coliformes (35°C, 45°C e *Escherichia coli*), *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Finalmente, ressaltou-se a importância do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e a problemática do uso indiscriminado de antibióticos na produção animal que contribui para o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos.

Palavras-chave: Segurança alimentar, bactérias patogênicas, susceptibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

Santos, G.C.F. Microbiological quality of milk and cheese sold in retail stores in Cruz das Almas - Bahia.

Was performed a review on the general aspects of the fresh milk, cheese curd and cheese from the north, emphasizing the failures of the entire production chain to the consumer, related to the hygienic-sanitary aspects. Added to this was discussed with the microbiological limits recommended by the legislation for these products. It was then described aspects related to public health related to Diseases by Food, major pathogens associated with milk and cheese and symptoms. It was also pointed to the lack of epidemiological data regarding outbreaks caused by foodborne bacteria and the lack of supervision during production and quality control. Featuring the following groups of micro-organisms: mesophilic and psychrotrophic aerobic heterotrophic bacteria, mold and yeast, the group of coliforms (35°C, 45°C and *Escherichia coli*), *Salmonella* and *Staphylococcus* coagulase positive. Finally, he stressed the importance of antimicrobial susceptibility testing and the problem of indiscriminate use of antibiotics in animal production and contributing to the emergence of bacteria resistant to antibiotics.

Keywords: Food safety, pathogenic bacteria, antimicrobial susceptibility.

1. Leite in natura

O leite é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta e em condições de higiene de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). É um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo, fácil assimilação e por ser consumido por pessoas de diferentes idades e classes sociais. Do ponto de vista biológico é um dos alimentos mais completos que apresenta entre outras características, alto teor de água (87%), 4,6% de lactose, 3,9% de gordura, 3,2% proteínas, 0,9% de sais minerais e vitaminas (HOFFMANN et al., 1999; FRANCO et al., 2000) e por isso, considerado excelente substrato para o crescimento e multiplicação de diversos micro-organismos (LANDGRAF, 2006; BARTOSZEWICZ et al., 2008).

A obtenção do leite deve ser feita em condições adequadas de higiene, atentando-se para fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos, influência das estações do ano, práticas de produção e manuseio na fazenda, qualidade bacteriológica da água, localização geográfica, temperatura de conservação do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção na indústria, até o consumidor final (HUHN et al., 1980; MILKBIZZ, 1996). Além desses aspectos, características microbiológicas, presença de conservantes químicos e resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas também devem ser considerados (BRITO E BRITO, 1998; MONARDES, 1998; ZOCHE et al., 2002; SANTOS, 2004) a fim de se evitar casos de toxinfecção à população consumidora.

Visando à produção de leite de boa qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a Instrução Normativa nº51 (IN 51), em 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), que estabelece padrões e normas para a produção de leite no país, a fim de atender aos consumidores que exigiam um alimento de qualidade, bem como o setor laticinista, favorecendo o seu crescimento. Uma das principais normas exigidas na IN 51 é que o leite in natura seja mantido refrigerado desde a ordenha até o beneficiamento, mantendo a qualidade nutricional e microbiológica, ao evitar o aumento da carga microbiana inicial de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, em especial, os mesófilos.

Entretanto, estudos têm revelado que as novas exigências, por si só, não garantirão um produto de boa qualidade (SANTANA, 2001; SERRA, 2004). A proibição legal, imposta à comercialização do leite in natura no Brasil (Lei n 1.283 de 18/12/1950 e Decreto n 30.691 de 29/03/1952, não fez com que sua venda tenha deixado de ser realizada abertamente em diversas cidades do Brasil, muitas delas possuidoras de elevado nível socioeconômico e cultural, mas principalmente nas cidades interioranas, onde há a crença de que esse alimento consumido na forma in natura seja a melhor opção, por ser mais nutritivo, além de possuir um menor custo (NERO et al., 2003).

A venda desse leite é preocupante, pois serve de veículo para inúmeros micro-organismos patogênicos ao homem e, a este respeito, a Organização Mundial de Saúde evidenciou a existência de sete enfermidades viróticas básicas e 16 bacterianas (BRANDÃO, 1994), destacando-se ricketisioses (febre Q), infecções e intoxicações bacterianas (tuberculose, brucelose, listeriose, clostridioses), intoxicações alimentares (principalmente devido à toxina de *Staphylococcus aureus*), febres tifóide e paratifóide, salmonelose e intoxicações estreptocócicas.

2. Queijo de coalho e requeijão do norte

A produção de queijo artesanal a partir do leite in natura é uma atividade tradicional, possuindo em todo o Nordeste do Brasil importância econômica por se tratar de um produto amplamente consumido pela população local e por turistas que visitam a região, além de ser uma das principais fontes de renda de pequenos produtores.

Segundo Beresford et al. (2001), a fabricação de queijos foi originalmente concebida com o objetivo de estender o prazo comercial do leite nas fazendas situadas distante dos centros consumidores e laticínios, bem como conservar seus componentes nutricionais. Com o desenvolvimento tecnológico de sua produção, surgiu no Brasil, muitas variedades, sendo algumas de expressão regional (BORGES et al., 2003), como é o caso dos queijos de coalho e requeijão do norte. Atualmente no Brasil a produção de queijos é bastante expressiva. Pesquisas realizadas pelo SEBRAE (2008) mostraram que entre 2002 e 2006, este mercado cresceu cerca de 20%, com aumento da produção de 477.300

toneladas para 572.000 toneladas por ano, existindo no Nordeste cerca de 2,2 milhões de pequenos e médios produtores de lácteos e destes, cerca de 85% trabalham com o queijo de coalho.

O queijo é um alimento rico em proteínas, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio e vitaminas, existindo em todo o mundo mais de 1.000 tipos, elaborados a partir de diferentes tipos de leite e diferentes processos de produção (LÁCTEA BRASIL, 2006). Segundo a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado, obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (RTIQ) (BRASIL, 1996) recomenda que o leite destinado à produção de queijo seja submetido à pasteurização, garantindo a inocuidade do produto. Apesar das recomendações do RTIQ, vários surtos envolvendo queijos produzidos com leite in natura têm sido reportados nos últimos anos e, dentre os micro-organismos envolvidos encontram-se *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, dentre outros (SILVA et al., 2001; FORSYTHE, 2002; RAPINI et al., 2002).

Dentre os fatores que contribuem para a má qualidade microbiológica é citado o baixo padrão tecnológico, a falta de padronização, a falta de critérios de qualidade da matéria-prima e processamento aplicado. Além disso, durante a comercialização, principalmente no mercado local, é comum a venda do produto em balcões sem proteção e à temperatura ambiente, para que somente a noite seja acondicionado em refrigeradores.

O RTIQ define o queijo de coalho, aquele que se obtém por coagulação do leite por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado com até dez dias de fabricação. É classificado como queijo de média umidade (entre 36% e 45,9%) e alta umidade (entre 46% e 54,9%), massa semicozida ou cozida e teor de gordura variável entre 35% e 60%. A adição de condimento é permitida, desde

que seja mencionado no rótulo. O queijo deve apresentar uma consistência semidura, elástica; textura compacta (sem olhaduras mecânicas) ou aberta (com olhaduras mecânicas); cor branca amarelada uniforme; sabor brando, ligeiramente ácido e salgado; odor ligeiramente ácido de coalhada fresca e casca fina e não muito bem definida com o formato e peso variáveis. O acondicionamento do queijo de coalho deve ser feito em embalagens apropriadas com ou sem vácuo, devendo ser mantido a uma temperatura não superior a 12°C (BRASIL, 2001b).

Quanto aos padrões microbiológicos do queijo de coalho, a Resolução- RDC Nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a) estabelece dois níveis de tolerância em função do teor de umidade. Para os de média umidade (36%), o limite máximo permitido de *Staphylococcus* coagulase positiva é de até 10^3 UFC.g⁻¹ e para os coliformes a 45°C é de 10^3 a 5×10^3 NMP.g⁻¹. Nas amostras de alta umidade (46%) a legislação adota um limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva de até 5×10^2 UFC.g⁻¹, enquanto para o grupo dos coliformes a 45°C até 5×10^2 NMP.g⁻¹. *Salmonella* deve ser ausente em 25g da amostra para ambas as categorias.

Borges et al. (2003), analisando queijo de coalho produzido em vários estados do Nordeste (Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba e Pernambuco), relataram altos níveis de contaminação por bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Para Duarte et al. (2005) o consumo desse alimento constitui motivo de preocupação para as autoridades sanitárias regionais por representarem um risco à saúde do consumidor havendo a necessidade da criação de programas de gestão de segurança de alimentos assegurando produtos saudáveis e de valor nutritivo.

O requeijão do norte tem a massa obtida após ação do calor e estocada a diferentes temperaturas (congelada, resfriada ou ambiente) e embalagens (caixas plásticas e, principalmente, sacos plásticos), diminuindo sua validade comercial devido a possíveis contaminações microbiológicas (CALVACANTE E COSTA, 2005) e, apesar de sua importância nutricional e econômica, poucos estudos têm sido realizados, a fim de se averiguar a qualidade microbiológica do produto em âmbito nacional. Segundo a Instrução Normativa Nº 30 (BRASIL, 2001), entende-se por requeijão do norte, ou queijo de manteiga, “o produto obtido mediante coagulação do leite com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício por

meio da acidificação direta do leite, cuja massa é submetida à dessoragem, lavagem com água quente ou leite quente e fusão da massa, com acréscimo exclusivamente de manteiga de garrafa ou manteiga do sertão”. É adicionado sal, em seguida a massa fundida é transferida para formas, resfriada e embalada. Durante o estoque é mantida refrigerada até 10°C (BRASIL, 2001). Diferentemente do queijo de coalho, esse produto é obtido sem o uso do coalho, uma vez que a coalhada é obtida por desnaturação ácida. Sua textura é fechada, semi-friável, com pequenos orifícios mecânicos contendo gordura líquida no seu interior e de sabor pouco acentuado, lembrando manteiga, levemente ácido, podendo ser salgado e de cor amarelo-palha. É classificado como um queijo de alta umidade (54,9%). Para esse tipo de queijo a legislação (RDC nº 12) adota um limite máximo para *Staphylococcus* coagulase positiva de até 5×10^2 UFC.g⁻¹, enquanto para o grupo coliformes a 45°C o limite é de até 5×10^2 NMP.g⁻¹. *Salmonella* deve estar ausente no alimento.

3. Saúde pública

A segurança alimentar pode ser definida como um direito inalienável de todos os cidadãos, onde estes devem ter acesso permanente aos alimentos necessários, em quantidade e qualidade, que torne a vida digna e saudável (GOES et al., 2001). Considerado um desafio atual, a segurança dos alimentos deve estar presente em toda a cadeia de alimentos, desde a obtenção da matéria-prima até a distribuição final ao consumidor (CLEMENTE, 1999; SOLIS, 1999; PANETTA, 2002). Para que isso seja garantido, existem órgãos responsáveis pela fiscalização e estabelecimento de normas de produção, como o ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A segurança dos alimentos é preocupação de todos os profissionais ligados à saúde pública, pois alimentos contaminados podem causar toxinfecções alimentares (TIA's) (GERMANO E GERMANO, 2001; BERSOT et al., 2002). Sendo imprescindível a adequação, conservação e a higiene das instalações e equipamentos, além do grau de conhecimento dos manipuladores, a fim de garantir a qualidade dos alimentos (GERMANO E GERMANO, 2001) minimizando

os custos relacionados a tratamentos médicos, hospitalização, ausência no trabalho, dentre outros (PINTO, 1999).

As doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) são causadas por agentes ou toxinas (UNTERMANN, 1992) que penetram no organismo humano por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados, podendo ser de origem biológica (micro-organismos patogênicos e vírus) e de origem química (pesticidas e metais tóxicos) (AMSON et. al., 2006). Essa condição também é frequentemente denominada de Toxinfecção Alimentar (TIA) e os sintomas mais comuns incluem dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e febre, além de apresentarem um curto período de incubação. Em indivíduos muito jovens ou idosos e debilitados estas doenças podem originar complicações graves, conduzindo até mesmo à morte (HOOBS E ROBERTS, 1999; GERMANO E GERMANO, 2001). Alimentos contaminados por agentes biológicos são, portanto, a maior causa das enfermidades (NOTERMANS E VERDEGAAL, 1992).

Entretanto, poucos têm sido os casos notificados aos órgãos de inspeção de alimentos e às agências de saúde. Esse fato se deve, em parte, porque muitos patógenos presentes nos alimentos causam sintomas brandos e a vítima não busca auxílio médico, tornando difícil o rastreamento dos alimentos responsáveis pelas toxinfecções (FORSYTHE, 2002) e, embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar seja bastante elevada (FRANCO E LANDGRAF, 2008). Na maioria das vezes, as camadas menos favorecida da população são as mais afetadas pela contaminação alimentar, já que além da falhas do setor produtivo, há maus hábitos culturais de alimentação, além da necessidade de optar por produtos com menor preço e de baixa qualidade (BALBANI E BUTUGAN, 2001).

As regiões Norte e Nordeste do Brasil têm sido as que apresentam as maiores taxas de incidência de casos de pessoas acometidas de DTA internadas quando comparadas com as demais regiões (CARMO et al., 2005). Por isso, o conhecimento de como as DTAs ocorrem é fundamental para a implantação de medidas preventivas e de controle por parte das autoridades sanitárias, indústrias e outros estabelecimentos de alimentação (PINTO, 1999; GERMANO E GERMANO, 2001), detendo a disseminação da infecção (HOOBS E ROBERTS, 1999).

Os micro-organismos envolvidos em DTAs são classificados por meio de critérios e padrões microbiológicos, sendo ou não considerados responsáveis pela ocorrência do surto em questão (GRACIANO et. al., 2003). As bactérias são os principais agentes e as espécies envolvidas podem ser classificadas em três grupos. No primeiro grupo é necessária uma dose infectante muito baixa, como por exemplo, a *Escherichia coli* O157:H7, para que ocorra a doença. No segundo grupo a presença da bactéria é fundamental para a manifestação da doença, como é o caso da *Salmonella* spp. e no terceiro grupo, a multiplicação bacteriana e consequentemente a produção de toxinas é pré-requisito para a ocorrência da doença (*Staphylococcus aureus*). Assim, a patogenicidade dos micro-organismos é o principal pré-requisito para a caracterização de cepas patogênicas e identificação específica (MÜRMAN, 2004).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes etiológicos responsável pelas DTAs envolvido em aproximadamente 50% dos casos investigados, seguido pela *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (GERMANO E GERMANO, 2001). Em muitos países o agente que apresenta maior frequência tem sido a *Salmonella* spp. (GUINGUET et al., 1992). Przybylska (2003) encontrou *Salmonella enteritidis* em 93,4% das toxinfecções alimentares registradas em 2001 na Polônia, enquanto Carmo et al. (2005) relatou sua presença em 12% dos casos registrados entre 1999 e 2004 no Brasil.

4. Micro-organismos indicadores de qualidade

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, alta contagem de micro-organismos (ARAÚJO et al., 2002; SCHOUTEN et al., 2004; ARCURI et al., 2008), além dos queijos artesanais elaborados com a matéria-prima in natura. O número e o tipo de micro-organismos presentes nos alimentos podem ser usados para avaliar com segurança a qualidade microbiológica dos mesmos. Desta forma, avaliação de micro-organismos indicadores podem ser usados para verificar a qualidade microbiológica ou segurança alimentar quando há uma relação entre a ocorrência de um micro-organismo indicador e a provável presença de um patógeno ou toxina pré-formada (DOYLE et al., 1997). Alguns critérios devem ser considerados na definição de um micro-organismo ou grupo de micro-organismos usados como indicadores, por exemplo, deve ser de rápida

e fácil detecção; não deve estar presente como contaminante natural do alimento, pois assim sua detecção não indicará, necessariamente, a presença de matéria fecal ou de patógenos; deve ser facilmente distinguível de outros micro-organismos da microbiota do alimento; deve ter velocidade de morte que seja ao menos semelhante à do patógeno, ou estar presente em quantidades mínimas; deve estar presente quando o patógeno associado estiver; seu número deve se correlacionar com o do patógeno; deve apresentar necessidades e velocidade de crescimento semelhantes às do patógeno. No entanto, nem sempre todas essas características são observadas (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Estes micro-organismos podem não oferecer um risco direto à saúde, como a contagem padrão em placas de mesófilos, bolores e leveduras, psicrótrófos e termófilos, ou podem oferecer um risco baixo e indireto à saúde, como é o caso dos enterococos e as enterobactérias (HAJDENWURCEL, 1998).

4.1. Micro-organismos heterotróficos mesófilos aeróbios

Os micro-organismos mesófilos aeróbios são um grupo de bactérias que fermentam a lactose em ácido láctico e possuem temperatura ótima de crescimento na faixa de 20° a 40°C, sendo a média de 35°C. A contagem destes micro-organismos pode ser utilizada como indicador da qualidade higiênica do leite e derivados, principalmente quando houver suspeita de longa exposição à temperatura ambiente (HARDING, 1995). Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações sensoriais do alimento, um número elevado de micro-organismos indica que o alimento é insalubre, à exceção de alimentos fermentados (FRANCO E LANDGRAF, 2008) e que houve falhas em uma ou mais etapas da produção do alimento (JAY, 1992; SILVA JR, 2005).

Vale ressaltar que a microbiota mesófila compreende a maioria dos contaminantes do leite (BRASIL, 1993) e quando o produto é comercializado informalmente, sem os devidos cuidados de conservação, a susceptibilidade de deterioração é maior, o que contribuiu para a qualidade insatisfatória do produto analisado. Resultados divulgados pela Rede Brasileira para Monitoramento da Qualidade do Leite (RBQL), após a implantação da IN 51 apontam que, entre os

questos avaliados que não atenderam à conformidade de qualidade do leite destacou-se a contagem bacteriana total (PINTO E ISIDORO, 2007).

Souza (2008) pesquisando a qualidade microbiológica de 15 amostras de leite in natura produzido na Ilha de São Luís - MA evidenciou contagem de bactérias mesófilas de 10^6 UFC.mL⁻¹ em 13,3% das amostras analisadas. Pinto et al. (2006) onde relataram contagens de mesófilos variando de $1,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹ a $1,4 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. De 36 amostras analisadas, 11 (30,56%) apresentaram resultado acima do padrão estabelecido pela IN nº 51 para o leite in natura refrigerado ($1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹).

A contagem de micro-organismos mesófilos é contemplada na atual legislação brasileira para leite in natura (IN 51, BRASIL, 2002). Entretanto, muitas dessas normas não são seguidas. Assim, uma das principais justificativas para a quantificação desse grupo de bactérias é que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

4.2. Micro-organismos heterotróficos psicrófilos aeróbios

Os micro-organismos psicrófilos crescem em alimentos sob refrigeração, entre 0-7°C, mas apresentam temperatura ótima acima de 20°C. São definidos como micro-organismos capazes de produzir crescimento visível a 7+/-1°C no prazo de 7 a 10 dias, independente de sua temperatura ótima. Na classificação tradicional dos micro-organismos em função da temperatura – termófilos, mesófilos e psicrófilos – os psicrófilos são um subgrupo dos mesófilos, não dos psicrófilos, porque esses últimos geralmente morrem à temperatura ambiente. Os psicrófilos, ao contrário, se multiplicam em alimentos refrigerados, mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila (SILVA et al., 2010).

Esse grupo é representado, principalmente, por bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp. e por bactérias Gram-positivas como *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Micrococcus* spp. (COUSIN, 1982; SORHAUG E STEPANIAK, 1997; PINTO, 2004).

Com a granelização, o leite passou a ser refrigerado na fazenda e o período de estocagem pré-processamento foi aumentado. Com isto, os micro-organismos

psicrotróficos, que antes correspondiam ao máximo de 10% da microbiota do leite in natura, passaram a predominar no leite (PEREIRA JUNIOR, 2002). Nesse sentido, a conservação à temperatura de refrigeração por períodos prolongados, pode resultar na perda de qualidade dos produtos lácteos devido a associação do crescimento e atividade enzimática dessas bactérias (PINTO, 2004). Entretanto, o procedimento de estocagem do leite in natura na fonte de produção, sob refrigeração possui vantagens de reduzir custos operacionais de produção e perda da matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesofílicas já que a taxa de crescimento bacteriana é reduzida, o que não impede a multiplicação dos micro-organismos psicrotróficos (ENEROTH et al., 2000). Para Murphy e Boor (2000), quanto maior o tempo de armazenamento do leite in natura antes do processamento, maiores serão as chances da população de psicrotróficos aumentar.

A qualidade dos produtos lácteos pode ser afetada pela atividade de enzimas termorresistentes, como proteases e lipases extracelulares, produzidas por psicrotróficos antes e após o processamento térmico (FRANK, 1997; SORHAUG E STEPANIAK, 1997). A atividade enzimática de proteases produzidas por bactérias psicrotróficas afeta as propriedades do leite in natura e a qualidade de produtos lácteos tratados termicamente (LAW, 1979; GREGORY et al., 1986). Estas enzimas são estáveis a altas temperaturas (LIAO E MCCALLUS, 1998) e resistem aos tratamentos de pasteurização e esterilização comercial (GREGORY et al., 1986; RAJMOHAN et al., 2002). Entretanto, são sensíveis às temperaturas na faixa de 50°C a 60°C devido à autodegradação, apresentando atividade ótima em torno de 30° a 45°C (SORHAUG E STEPANIAK, 1997).

No Brasil, alguns estudos evidenciaram altas contagens de bactérias psicrotróficas em leite in natura refrigerado (SOUZA et al., 1999; BRITO et al., 2002; BRUM et al., 2004). Pinto et al. (2006) encontraram elevadas contagens desses micro-organismos no leite de fornecedores de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira. Nas 33 amostras de leite coletadas de tanques individuais, as contagens variaram de $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ e para 12 tanques coletivos, de $8,9 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Arcuri et al. (2008) ao analisarem amostras de leite in natura produzido na região da Zona da Mata de Minas Gerais e Sudeste do Rio de Janeiro, sendo 20 amostras de tanques coletivos e 23 de tanques individuais, observaram que as contagens nas amostras

de leite para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre 10^2 e 10^7 UFC.mL⁻¹, indicando que em muitas propriedades houve deficiência nas práticas higiênicas e a mistura da matéria-prima de diversos produtores em tanques coletivos aumentaram os riscos, comprometendo a qualidade final do produto.

4.3. Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras são originários do solo ou do ar e bastante resistentes às condições adversas como pH ácido e baixa atividade de água. A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25° a 28°C (SILVA et al., 2010). O crescimento desses micro-organismos em alimentos de baixa acidez e alta atividade de água é mais lento do que das bactérias e dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos, sendo mais fácil sua contaminação em alguns queijos que possuam atividade de água inferior à do leite, enquanto que em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, o crescimento dos fungos é maior, provocando deterioração (FRANCO, 2003).

A presença de fungos em alimentos é indesejável, inclusive na indústria de produtos lácteos, pois podem provocar deterioração, desencadear fermentação e/ou maturação desejáveis aos derivados do leite (MINERVINI et. al., 2001) e sua ocorrência pode determinar o desenvolvimento de doenças infecciosas ou tóxicas em vegetais ou animais, além do homem. Porém a simples presença do fungo não é fator determinante de doença, que depende da relação parasita/hospedeiro (LACAZ et al., 1998).

Diversos fungos podem estar associados à doenças infecciosas no ser humano e animais, enquanto outros podem produzir metabólitos tóxicos, as micotoxinas, que são produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos e podem estar presentes em alimentos, como amendoim, milho, trigo, cevada, café, leite, arroz, farinhas, nozes, castanhas, frutas secas, entre outros, podendo ameaçar a inocuidade dos mesmos. (MINERVINI et. al., 2001; LACAZ et al., 2002; BANDO et al., 2007). Também são responsáveis por determinadas micoses, à exemplo da micose sistêmica que atinge os órgãos internos e vísceras, podendo abranger muitos tecidos e órgãos diferentes (TRABULSI et al., 2004). Segundo Kern e Blevins (1999), os fungos estão

associados a quadro patológicos como alergias, otomicoses, lesões do palato duro, meningites, endocardites, doenças sistêmicas, gastrointestinais, pulmonares, geniturinárias, cutâneas, subcutâneas e ósseas. Desta forma, o consumo de leite contaminado por esses micro-organismos, ou mesmo de toxinas por eles produzidas, pode acarretar danos à saúde do consumidor.

Os fungos ainda podem estar presentes no leite como contaminantes de medicamentos para mastite, diluentes de antibióticos, oriundos da água de lavagem dos equipamentos de ordenha ou ainda, das mãos do ordenhador (CRAWSHAW et al., 2005; WILLIAMSON E MENNA, 2007). Medidas higiênic-sanitárias não conduzidas adequada ou satisfatoriamente podem facilitar a contaminação desse produto, causando-lhe alterações físico-químicas, limitando sua validade comercial e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (ANDRADE, 2001).

Ruz-Peres et al. (2004) analisaram 50 amostras coletadas de tanques de expansão e detectaram a presença de bolores e leveduras em todas, com uma média de contagens de 10^3 UFC.mL⁻¹. Por sua vez, Desmaures et al. (1997) estudaram 39 amostras de leite in natura refrigeradas de 20 fazendas leiteiras, cuja a média de contagem de leveduras foi de $6,9 \times 10$ UFC.mL⁻¹. Alves et al. (2009) em pesquisa realizada com amostras de queijo de coalho obtidas no comércio informal de São Luis – MA, observaram uma frequência de 10^5 a 10^6 UFC.g⁻¹, e relataram que o Ministério da Saúde não especifica limites microbiológicos para bolores e leveduras nesse alimento.

Tendo em vista que os fungos pertencem ao grupo dos micro-organismos ambientais, a presença destes agentes em amostras de leite e queijo, poderia estar associada a deficiências quanto às condições higiênicas de obtenção e acondicionamento do produto. Assim sendo, medidas de manejo adequado frente às mastites causadas por fungos, bem como a realização apropriada de manejo e higiene de ordenha e de ambiente, poderiam se constituir em fatores capazes de minimizar a ocorrência de mastites por fungos bem como reduzir a contaminação durante o processo de ordenha (MELVILLE et al., 2006).

4.4. Grupo dos coliformes

Os coliformes são bactérias indicadoras cuja avaliação pode fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias do processamento e armazenamento, possível presença de micro-organismos patogênicos e indicação do potencial de deterioração do alimento (HAJDENWURCEL, 1998).

O grupo dos coliformes totais é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35° - 37°C por 48 horas. Fazem parte desse grupo predominantemente às bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destas, apenas a *Escherichia coli* é usada, desde 1892, como indicadora de contaminação de origem fecal, já que é encontrada no intestino do homem e de animais de sangue quente (FRANCO e LANGRAF, 2008), embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde resistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal, como a *Salmonella* e a *Shigella* spp. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (JAY, 1992).

Por outro lado, as bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes termotolerantes correspondem aos coliformes totais que apresentam capacidade de continuar fermentando a lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44° - 45,5°C. Pesquisa de coliformes termotolerantes ou *E. coli* nos alimentos fornece, com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos, além do mais, em alimentos processados, a presença de um número considerável de coliformes ou de *Enterobacteriaceae* indica que houve processamento inadequado e/ou recontaminação pós-processamento, sendo as causas mais frequentes aquelas provenientes da matéria-prima, equipamentos sujos ou manipulação sem cuidados de higiene (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Leite et al. (2002), analisando amostras de queijo de coalho comercializado em Salvador, BA, constataram que 90,62% das amostras se encontravam em condições impróprias para o consumo, por apresentarem valores acima dos

estabelecidos pela legislação vigente. Destas, 37,50% foram identificadas com *E. coli*. Estudo com amostras de queijo no Ceará mostraram a presença de coliformes totais, além de termotolerantes em 74,4% das amostras com níveis superiores aos padrões estabelecidos pela legislação e confirmação de *E. coli* em 93% das amostras (BORGES et al., 2003).

Segundo Roitman et al. (1987), medidas efetivas para o controle de *E. coli* são similares às aquelas mencionadas para outras enterobactérias, particularmente a higiene rigorosa na manipulação dos alimentos, os cuidados para evitar contato direto ou indireto de alimentos preparados com utensílios e equipamentos utilizados no manuseio de matérias-primas, minimizando, portanto, a possibilidade de recontaminação ou contaminação cruzada, a refrigeração adequada de alimentos preparados e a cocção dos produtos antes do consumo.

4.5. *Staphylococcus coagulase positiva*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são classificadas como cocos Gram-positivos que formam um aglomerado de células, anaeróbias facultativas, com temperatura de crescimento na faixa de 7° a 47,8°C. As enterotoxinas são produzidas entre 10° e 46°C, com temperatura ótima entre 40° e 45°C, portanto quanto mais baixa a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção da enterotoxina, a partir de uma atividade de água de 0,86 e ótima de 0,99 (CÂNDIDA, 2002). Esporos e flagelos não são observados.

Essas bactérias estão presentes no leite em casos de infecções mamárias nos bovinos (mastite), embora também possam ser transmitidos ao alimento por manipuladores infectados por meio da mucosa nasal ou ferimentos (MACEDO E PFLANZER JÚNIOR, 2005). Os manipuladores de alimentos podem se tornar uma fonte potencial de contaminação e disseminação de vários patógenos, inclusive de *Staphylococcus* spp. (REZENDE et al., 1997; RAPINI et al., 2004), pois tendo suas mãos como veículo de trabalho podem, por meio do contato direto, perpetuar a cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica (RADDI et al., 1998). Segundo Feitosa et al. (2003), a prevalência desta bactéria como agente etiológico na mastite bovina, sua ubiquidade na natureza e o baixo nível socioeconômico e cultural dos ordenhadores são fatores que favorecem a contaminação dos produtos lácteos.

Staphylococcus aureus é um patógeno responsável por intoxicações que resultam da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas termoestáveis e pré-formadas (SU E EWONG, 1997). Alimentos com contagens variando de 10^4 a 10^8 UFC.g⁻¹ já apresentam enterotoxinas (CARMO E BERGDOLL, 1990), sendo que os tratamentos térmicos disponíveis para o leite não são capazes de inativar as enterotoxinas presentes, constituindo um risco potencial para o consumidor (LAMAITA et al., 2005).

No Rio Grande do Norte foi observado *S. aureus* em 72,7% das amostras de queijo de coalho, com contagens variando de $7,0 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (FEITOSA et al., 2003). No Ceará, destacam-se os trabalhos de Santos et al. (1995), Hiluy e Araújo (1999), Borges et al. (2003), Bruno et al. (2005), Lima (2005) que, ao investigarem amostras de queijo de coalho, constataram índices de 62,5%, 96%, 91%, 54% e 50%, respectivamente, de amostras em desacordo com a legislação (10^3 UFC.g⁻¹). No Rio Grande do Norte, Paiva e Cardonha (1999) e Feitosa et al. (2003) revelaram percentagens de 30% e 72,7%, respectivamente de amostras de queijos de coalho acima dos padrões legais para *Staphylococcus* coagulase positiva. Em Recife (PE), Mendes et al. (1999) avaliaram 105 amostras de queijo de coalho procedentes de 15 municípios, comercializadas na cidade e verificaram que todos os municípios apresentavam amostras de queijos acima dos padrões legais, em porcentagem que variou de 13% a 90%.

A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* é um dos tipos mais comuns de DTAs em todo o mundo (RODRIGUES et al., 2004). A RDC nº 12, estabelece padrões microbiológicos sanitários para alimentos, com uma tolerância máxima de 5×10^2 UFC.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo de alta umidade (55%), incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente (BRASIL, 2001a), enquanto para o leite cru, a legislação não estabelece padrões, já que esse alimento está proibido de ser consumido na forma in natura.

4.6. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae* definida como bastonete Gram-negativo e anaeróbio facultativo não produtor de esporos. A maioria é móvel, por meio de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. pullorum* e *S.*

gallinarum, que são aflagelados (BERSOT, 2004). O pH ótimo para multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. A temperatura ideal para a sua multiplicação é de 35 - 37°C, sendo o mínimo de 7°C e o máximo de 47°C, a atividade de água requerida deve ser superior a 0,94 (JAY, 1992). As estirpes mais frequentemente envolvidas nos surtos alimentares são de *S. enterica* subsp. *enterica*, presentes na microbiota intestinal dos animais de sangue quente e respondem por 99% das salmoneloses humanas (SILVA et al., 2010).

De acordo com Ávila e Gallo (1996), levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento, e os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de transmissão da bactéria. Ainda segundo os autores, nos países em desenvolvimento, as diarreias agudas causadas por água ou alimentos contaminados, constituem a principal síndrome das febres tifóide, paratifóide e das salmoneloses, que têm sido responsáveis por elevada taxa de mortalidade e morbidade infantil. A taxa de mortalidade situa-se ao redor de 4,1%, sendo os ovos, carnes de aves, produtos cárneos e seus derivados os alimentos que mais comumente, transmitem a *Salmonella* ao homem. Quando os produtos lácteos estão envolvidos, há ligação com o consumo de leite in natura, leite pasteurizado de forma inadequada e queijos. Casos relacionados ao consumo de ovos e ou derivados, envolvem o consumo de saladas à base de ovos (maionese), sorvetes e outras sobremesas de fabricação caseira, além de produtos de panificação e confeitaria (JAY, 1992).

Jay (2000) cita a ocorrência de um dos maiores surtos de salmonelose registrados nos Estados Unidos, em 1994, envolvendo mais de 224.000 pessoas, atingindo quarenta e um estados. Neste caso, o agente causal foi *S. enteritidis*. O veículo de contaminação foi o sorvete produzido de leite transportado em caminhão tanque que carregou anteriormente ovo líquido. Segundo Nadvorny et al. (2004), no Rio Grande do Sul foi verificado que desde 1993, a salmonelose tem sido a DTA de maior ocorrência. Entre 1987 a 2000, a *Salmonella* correspondeu a 34,1% dos 1.298 surtos investigados de doenças transmissíveis por alimentos sendo considerada o agente prevalente nos surtos investigados em 2000. Os autores constataram que 74,7% dos surtos ocorridos no ano 2000 foram

ocasionados por *Salmonella* spp. e que a utilização de matéria-prima sem inspeção sanitária e a manipulação incorreta dos alimentos constituíram-se nos fatores predisponentes à contaminação dos alimentos. Os produtos de laticínios são um dos mais importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp. e o consumo de queijo de coalho contaminado por esta bactéria pode representar risco à saúde da população nordestina, visto que este é um alimento típico e acessível à maioria das classes sociais do Nordeste além dessa bactéria ser capaz de manter-se viável, por um longo tempo (ÁVILA E GALLO, 1996; MODI et al., 2001; DUARTE et al., 2005).

Peresi et al. (1998), analisando dados de surtos alimentares na região Noroeste do Estado de São Paulo, concluíram que a *S. enteritidis* pode ser responsável por provocar doenças graves, sobretudo em pacientes de faixas etárias extremas, o que se revela pela necessidade do grande número de hospitalizações, representando elevados custos econômicos e sociais. Por ser uma bactéria potencialmente capaz de provocar infecção alimentar, a legislação brasileira considera impróprio para o consumo humano o alimento que apresentar a presença deste micro-organismo (FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2003).

5. Antimicrobianos

Com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica, Ehrlich e seus colaboradores Franke e Roehl em 1905, descobriram o fenômeno da resistência aos fármacos, ao observarem que em culturas de tripanossomas em africanos tratados com arsênico ou com determinados corantes havia a sobrevivência de alguns exemplares (TAVARES, 2001). Em 1928, o pesquisador Fleming ao verificar a sensibilidade dos micro-organismos aos antibióticos observou a ação de uma substância produzida por um fungo denominada posteriormente de penicilina (WHO, 2000). A partir daí, muitas outras substâncias antimicrobianas foram descobertas e desenvolvidas como derivados da penicilina (estreptomicina, tetraciclina, quilononas, dentre outras).

Os antimicrobianos incluem os compostos naturais (antibióticos) e seus derivados e também os compostos sintéticos (ROBBERS et al., 1997). Fazem parte da classe dos fármacos antimicrobianos os antibacterianos, antifúngicos,

antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais (ROCHENBACH, 2008). A resistência aos antimicrobianos é um dos grandes problemas da medicina e da medicina veterinária, e é causada basicamente pela evolução das bactérias, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (ANDRADE, 2002). Essa resistência é caracterizada pela capacidade que a bactéria tem de superar o mecanismo de ataque dos antimicrobianos (TRABULSI et al., 2004).

No quadro abaixo, os fármacos antimicrobianos (antibacterianos) estão classificados conforme seu mecanismo de ação e sua estrutura química.

Quadro 1. Classe dos antimicrobianos e seus mecanismos de ação.

Classe dos Antimicrobianos	Mecanismo de Ação	Antimicrobianos
Nitrofuranos	Agentes antimicrobianos diversos	Nitrofurantoína
Penicilinas (β-lactâmico)	Agentes que agem na parede celular bacteriana	Ampicilina, amoxicilina/clavulonato, penicilina, oxacilina, piperacilina/tazobactam
Monobactâmicos (β-lactâmico)		Aztreonan
Cefens (β-lactâmico)		Cefalotina (1ª geração), cefoxitina (2ª geração), cefotaxima, cefodizima, cefpodoxima, ceftazidima (3ª geração), cefepime (4ª geração),
Carbapenêmicos (β-lactâmico)		Imipenem, meropenem, ertapenem
Glicopeptídeos		Vancomicina
Aminoglicosídeos		Agentes que afetam a síntese de proteínas bacterianas
Lincosamidas	Clindamicina	
Fenicóis	Cloranfenicol	
Macrolídeos	Claritromicina, eritromicina, azitromicina	
Tetraciclina	Tetraciclina	
Quinolonas	Agentes que afetam a síntese de ácidos nucleicos	Acido nalidixico, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, perfloxacina
Ansamicinas		Rifampicina
Sulfonamidas	Inibidores da via metabólica dos folatos	Sulfanilamida, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol/trimetropim, sulfacetamida

(GOODMAN E GILMAN, 1996; RANG et al., 1997; TAVARES, 2001; NCCLS, 2005).

Existem numerosos mecanismos distintos pelos quais os micro-organismos podem exibir resistência aos antimicrobianos (BROOKS et al., 2000). Esses mecanismos incluem: inibição da parede celular, inibição da síntese de proteínas, rompimento do metabolismo do DNA, alteração da função normal da membrana celular e inibição da síntese de alguns metabólitos essenciais (ROBBERS et al., 1997). As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. Em geral, classificam-se como resistentes as bactérias que crescem, *in vitro*, nas concentrações médias que os antimicrobianos atingem no sangue, quando administrados por via oral e sensíveis as que não crescem nessas concentrações (TRABULSI et al., 2004).

A resistência aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural das espécies de bactérias ou adquirida por estirpes individuais dentro de uma população sensível (TAVARES, 2001). A resistência natural ocorre quando os genes de resistência fazem parte do código genético do micro-organismo, enquanto que a resistência adquirida ocorre quando os genes de resistência não estão presentes no código genético da bactéria, sendo a ele incorporados (TRABULSI et al., 2004). Os antibióticos podem, em soluções diluídas, impedir temporária ou definitivamente as funções vitais de outros micro-organismos, determinando efeitos bacteriostático e bactericida. O primeiro apenas inibe o crescimento celular evitando sua multiplicação e facilitando a ação do sistema imunológico e o segundo extermina a célula bacteriana (LORENZ et al., 1996).

De acordo com Stöhr e Wegener (2001), o problema do aumento da resistência bacteriana não é somente devido ao mau e intensivo uso de antimicrobianos, mas também devido à transmissão de micro-organismos resistentes do animal para o homem, através do consumo de alimentos ou mesmo pelo contato direto com animais. A resistência de micro-organismos aos antimicrobianos é um sério e emergente problema de saúde pública (MCEWEN E FEDORKA-CRAY, 2002). É necessário que ações imediatas sejam tomadas pelas autoridades, no sentido de fiscalizar desde a comercialização, até a utilização dos fármacos em animais produtores de alimentos. Além disso, é necessário chamar a atenção da sociedade, comerciantes e produtores à respeito da gravidade da ampla e inadequada utilização e a conseqüente disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos.

6. Referências Bibliográficas

ALVES, L.M.C. et al. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - Ma. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n.2, p. 01-13, 2009.

AMSON, G.V., HARACEMIV, S.M.C., MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por limentos (Dtas) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 06, p. 1139-1145, 2006.

ANDRADE, M.A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **A Hora Veterinária**. v. 20, n.119, p.19-26, 2001.

ANDRADE, S.P. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Rocca, 2002, 697p.

ANDRÉ, M.C.D.P.B. et al. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, leite cru e queijo Minas Frescal em laticínio de Goiás, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.130, 2005.

ARAÚJO, V.S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 6, p.1172-1177, 2002.

ARCURI, E.F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado na fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARIMI S.M. et al. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. **Acta Tropica**, v. 96, n. 01, p.1-8, 2005.

ÁVILA, C.R.; GALLO, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado Tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**, v. 53, n.1, p.159-163, 1996.

BALBANI, A.P.S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 04, p. 320-328, 2001.

BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 03, p. 175-180, 2007.

BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B.M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat – treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, n. 04, p. 588-596, 2008.

BERESFORD, T.P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BERSOT, L.S. Cadeia produtiva de suínos e disseminação de *Salmonella*. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.10, n. 31, p.15- 20, 2004.

BERSOT, L.S. et al., Acompanhamento higiênico-sanitário em estabelecimentos manipuladores de alimentos no município de Palotina, PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1., 2002, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SPPrMV, 2002. p. 199.

BOISSEAU, J. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p.187-192, 1993.

BORGES, M.F.; BRANDÃO, S.C.C.; PINHEIRO, A.J.R.; Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 02, p.145-149, 1989.

BORGES, M.F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira CEPPA**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BRANDÃO, S.C.C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Revista Balde Branco**, v.360, p.68-71, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria nº 101 de 16 de agosto de 1993. Aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes métodos microbiológicos **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n.156, Seção 1, p.11937,1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. (Regulamento técnico de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. ANEXO II – Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº 136-E, 16/072001b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução - RDC n. 12 de 02/01/2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 07-E de 10/01/2001a.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 março 1996. Seção 1, p. 3977.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V. P. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1998. 17p.

- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do ILCT**, v.57, n.19, p.83-88, 2002.
- BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Microbiologia médica**. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 609p.
- BRUM, J.V.F.; GONÇALVES, N.B., MASSON, M.L. Pesquisa de microrganismos psicotróficos em leite cru produzido nos estados do Paraná e Santa Catarina. Juiz de Fora, MG. **Revista do ILCT**, v. 59, n. 339, p.150-154, 2004.
- BRUNO, L.M. et al. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.
- BULLERMAN, L.B. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n.12, p. 2439-52, 1981.
- CALLAWAY, T.R.; HARVEY, R.B.; NISBET, D.J. The hygiene hypothesis and foodborne illness: too much of a good thing, or is our food supply too clean? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 03, n. 03, p. 217-219, 2006.
- CARMO, G.M.I. et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, n.06, p.1-7, 2005.
- CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 04, p. 320-303, 1990.
- CAVALCANTE, A.B.D.; COSTA, J.M.C. Padronização da tecnologia de fabricação do queijo de manteiga. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 02, p. 215-220, 2005.
- CLEMENTE, E.S. Controle higiênico-sanitário em supermercados. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 56, 1999.
- CORPET, D.E. An evaluation of methods to assess the effect of antimicrobial residues on the human gut flora. **Veterinary Microbiology**, v.35, p.199-212, 1993.
- CORRÊA, I. **Resistência a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva de leite mastítico bovino***. 2003. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal.
- COSTA, E.O. et al. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001. **Revista Nipagama**, v. 07, n. 02, p.13-20, 2005.
- CRAWSHAW, W.M.; MACDONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Records**, v.156, p. 812-813, 2005.

CREMONESI, P. et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 586-591, 2007.

DAYAN, A.D. Allergy to antimicrobial residues in food: assesment of the risk to man. **Veterinary Microbiology**, v. 35, p. 213–226, 1993.

DESMASURES, N.; OPPORTUNE, W.; GUEGUEN, M. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. **International Dairy Journal**, v. 07, p. 643-646, 1997.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2. ed. Washington: Amer Society for Microbiology, 1997. 768p.

DUARTE, D.A.M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 03, p. 297-302, 2005.

EMBRAPA. **Estatísticas do leite**. Disponível em <<http://www.embrapa.gov.br/producao>>. Acesso em: 17 de jan. de 2011.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, p.162-165, 2003.

FERREIRA, L.M. et al. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 04, p.1228-1234, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCO, R.M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p. 70- 77, 2000.

FRANK, J.F. Milk and dairy products. In: DOYLE, P.; BEUCHAT, R.; MONTVILLE, J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**, 1997. p. 101-116.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GARINO JR., F. **Avaliação da sensibilidade “in vitro” e “in vivo” de sorotipos *Escherichia coli* de casos de mastite bovina e pesquisa da produção de beta-lactamase e detecção múltipla resistência.** 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GÓES, J.A.W.; SANTOS, J.M.; VELOSO, I.S. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p.20-22, 2001.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **Godman & Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics.** 9. ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.

GRACIANO, R.A.S. et al. Avaliação da qualidade de produtos alimentícios procedentes de denúncias de consumidores. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 13, n. 03, p.10, 2003.

GREGORY, E.M.; KEN, N.E.; BARTLEY, J.P. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 97-115, 1986.

GUINGUET, M.; HUBERT, B.; LEPOTRE, A. Results of a one year surveillance of acute diarrhoea by general practitioners. In: WORLD CONGRESS FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATION, 3., 1992, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Oraniendruck GmbH, 1992. p. 72-75.

GÜLER, L. et al. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3149-3154, 2005.

HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos.** São Paulo: Fonte Comunicações, 1998. 66 p.

HARDING, F. **Compositional quality:** milk quality. Glasgow: Blackie Academic Professional, 1995. 165p.

HERNANDEZ, G. et al. Surveillance of food borne infections and intoxications, Spain years: 1976-1990. In: WORLD CONGRESS FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATION, 3., 1992, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Oraniendruck GmbH, 1992. p.33-36.

HILUY, D.J.; ARAÚJO, R.E.S. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de coalho comercializados em Fortaleza – CE. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 28-36, 1999.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos.** 4. ed., São Paulo: Varela, 1999. 376p.

HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; VINTURIM, T.M. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 55, 1999.

HUHN, S. et al. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar a plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 209, p.3-8, 1980.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**, 4.ed. New York: Chapman & Hall, 1992. 701p.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**. 6.ed. Maryland: Aspen, 2000. 679 p.

KAYLEGIAN, K.E. et al. Raw milk consumption beliefs and practices among New York state dairy producers. **Food Protection Trends**, v. 28, n. 03, p.184-191, 2008.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia médica**. 2.ed. São Paulo: Premier, 1999. 256p.

LACAZ, C.S. et al. **Guia para identificação fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998. p. 445.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LÁCTEA BRASIL. **Queijo**: alimento nobre e saudável. 2006. Disponível em: <www.lacteabrasil.org.br> Acesso em: 13 set. 2010.

LAMAITA, H.C. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 05, p. 702-709, 2005.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006. p.109-148.

LEITE, C.C. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador (BA). Importância para saúde pública. **Revista Analytica**, n. 02, p.8-41, 2002.

LIAO, C.; MCCALLUS, D.E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 914-921, 1998.

LIMA, A.F. **Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

LORENZ, M.D.; CORNELIUS, L.M.; FERGUSON, D. C. **Terapêutica clínica em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, 484p.

MACEDO, R.E.F.; PFLANZER JUNIOR, S.B. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. **Higiene Alimentar**, v. 19, n.128, p.103-108, 2005.

- MARTEL, J.L. et al. New Trends in regulatory rules and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, **Veterinary Research**, v. 32, p. 381-392, 2001.
- McEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 93-106, 2002.
- MELVILLE, P.A. et al. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 03, p. 295-301, 2006.
- MENDES, E.S. et al. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**, v.13, n. 66-67, p.122-126, 1999.
- MILKBIZZ, A. **Leite sai do latão e entra pelo cano**. São Paulo: Milkbizz, 1996.
- MINERVINI, F. et al. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p.141-146, 2001.
- MODI, R. et al. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheese made from raw and pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 07, p. 927-933, 2001.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Quebec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p.40-43.
- MORAES, P.M. et al. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 06, n. 02, p. 245-249, 2009.
- MÜRMAN, L. **Condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de Santa Maria/RS**. 2004. 110f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, RS.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, n. 8, p. 606-611, 2000.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 47-51, 2004.
- NASSIB, T.A.; EL-DIN, M.Z.; EL-SHAROUD, W.M. Assessment of the presence of *Salmonella* sp. in Egyptian dairy products using various detection media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p.405-409, 2003.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS (NCCLS) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**, v. 25, n.1, 2005.

NERO, L.A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 299-305, 2008.

NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão-PR. **Revista Ciências Agrárias**, v. 24, n. 01, p. 21-26, 2003.

NERO, L.A.; VIÇOSA, G.N.; PEREIRA, F.E.V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 02, p. 386-390, 2009.

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A.H. Existing and emergin foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.197-205, 1992.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 02, n. 02, p.115-129, 2005.

PAIVA, M.S.D.; CARDONHA, A.M.S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 33, 1999.

PANETTA, J.C. Inocuidade dos alimentos, da produção ao consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92-93, p. 03, 2002.

PEREIRA JÚNIOR, F.N. **Comparação de métodos de enumeração e de estimativa de microrganismos psicrotróficos em leite cru e avaliação do método de Moseley**. 2002. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista Saúde Pública**, v. 32, n. 05, p. 477-483, 1998.

PINTO, A.T. **Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no Estado do Rio Grande do Sul**. 1999. 125f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 2004. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 03, p. 645-651, 2006.

PINTO, J.P.A.N.; ISIDORO, T.B. Qualidade do leite A. introdução normativa nº. 51/MAPA e os novos paradigmas. **Higiene Alimentar**, v. 21, n.156, p.14.16, 2007.

PRZYBYLSKA, A. Foodborne infections and intoxications in Poland in 2001. **Przegi Epidemiology**, v. 57, n. 01, p. 85-98, 2003.

RABELLO, R.F. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 09, p. 3211-3219, 2005.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.F. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v. 22, n. 01, p. 36-40, 1988.

RAJMOHAN, S. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 205-213, 2002.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692p.

RAPINI, L.S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 01, p. 130-133, 2004.

RAPINI, L.S. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 60-65, 2002.

RAPINI, L.S. et al. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, p.162, 2003.

REZENDE, C.H.A.; COSTA-CRUZ, J.M.; GENNARI-CARDOSO, M.L. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de escolas públicas em Uberlândia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 02, n. 06, p. 392-397, 1997.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. Baltimore: Premier, 1997. 372p.

ROCHENBACH, G.C. **Avaliação do perfil e da resistência bacteriana nos efluentes de um hospital em Itajaí/Santa Catarina**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

RODRIGUES, K.L. et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, n. 01, p. 297-299, 2004.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1987.

RUZ-PEREZ, M. et al. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 663-665, 2004.

- SANTANA E.H.W. Microrganismos psicrotóxicos em leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 88. p. 27-33, 2001.
- SANTOS, F.A.; NOGUEIRA, N.A.P; CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 01, p. 31-361, 1995.
- SANTOS, M.V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo, 2004. p. 269-286.
- SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, **Veterinary Research**, v. 32, p.201-225, 2001.
- SCHOUTEN, J.M. et al. Prevalence estimation and risk factors for *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 64, n. 01, p.49-61, 2004.
- SEBRAE/ESPM. **Queijos nacionais**: estudos de mercados. São Paulo, 2008. 34p. (Série estudos de mercado sobre agronegócio).
- SERRA, M.J.B. **Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP**. 2004. 37f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- SILVA, I.M.M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2001.
- SILVA JUNIOR, E.A. Segurança alimentar. In: _____. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela; 2005. p.138-238.
- SOLIS, C.S. Gestão e certificação da qualidade de sistemas alimentares integrados. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, p. 266-267, 1999.
- SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-37, 1997.
- SOUZA, F.A. **Contagem de célula somáticas e qualidade microbiológica do leite cru produzido na Ilha de São Luís- MA**. 2008. 32f. TCC (Graduação) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis.
- SOUZA, M.R. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. **Revista do ILCT**, v. 54, n. 309, p. 238-241, 1999.
- STÖHR, K.; WEGENER, H.C. Non-human antibiotic use and resistance. **Drug Resistance Updates**. v. 3, p. 2007-2009, 2001.

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

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 1216p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 586p.

UNTERMANN, F. Foodborne infections and intoxications-biology of the causative agents. In: **WORLD CONGRESS FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS**, 3, 1992, Berlin. **Proceedings...** Berlin: Oraniendruck GmbH, 1992. p. 395-400.

VANEGAS, M.C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. **Food Control**, v. 20, p. 430-432, 2009.

WEGENER, H.C. et al. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. **Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum**, v. 92, n. 01, p. 51-57, 1999.

WILLIAMSON, J.H.; MENNA, M.v Fungi isolated from bovine udders, and their possible sources. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, p.188-90, 2007.

WILLIS, C. Antibiotics in the food chain: their impact on the consumer. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 11, n. 02, p. 153-160, 2000.

ZOCHE, F. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 07, n. 02, p. 59-67, 2002.

CAPÍTULO 2

Qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana do leite in natura comercializado em Cruz das Almas – Bahia

A ser enviado para a revista Interciencia

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DO LEITE IN NATURA COMERCIALIZADO EM CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Gleyde Córdova da França Santos, Aura Lacerda Crepaldi, Rebeca Ayala Rosa dos Santos, Norma Suely Evangelista Barreto e Márcia Luciana Cazetta

Gleyde Córdova da França Santos. Engenharia Agrônoma e Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Email: gleydecordova@yahoo.com.br.

Aura Lacerda Crepaldi. Discente do curso de graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB - Campus de Cruz das Almas – BA. Email a_crepaldi@hotmail.com.

Rebeca Ayala Rosa da Silva. Aluna do curso de licenciatura em biologia. Possui curso técnico em alimentos pelo SENAI-BA. Tem experiência na área de Boas Práticas de Fabricação de alimentos e de Microbiologia em alimentos e ambiental. Email: rebeca_rosa@yahoo.com.br.

Norma Suely Evangelista Barreto. Engenheira de Pesca pela Universidade Federal do Ceará (1998), mestrado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará (2001) e doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco (2006). Atualmente é professora adjunto I na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, atuando nas linhas de pesquisa Tecnologia do Pescado e Microbiologia. Email: nsevangelista@yahoo.com.br.

Márcia Luciana Cazetta. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina (1997), mestrado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (2000) e doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2005). Atualmente é professora adjunta da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Faz parte do corpo docente do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola (UFRB), desenvolvendo projetos de pesquisa na área de Microbiologia Aplicada (bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas) e Microbiologia de Alimentos. Email: malulz@yahoo.com.br.

RESUMO – Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica do leite in natura e a susceptibilidade das bactérias isoladas a antimicrobianos, foram colhidas 25 amostras de leite para a quantificação de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes (35°C e 45°C) e presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. A contagem média de micro-organismos mesófilos foi de $1,6 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, psicrotróficos $9,6 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, bolores e leveduras $3,8 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, coliformes a 35°C 4×10^5 NMP.mL⁻¹ e a 45°C $3,8 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹. Verificou-se a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 44% das amostras, com média de $7,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e de *Escherichia coli* em 76% das amostras. Não houve detecção de *Salmonella* em nenhuma das amostras avaliadas. *Escherichia coli* apresentou resistência a tetraciclina (57,9%), ampicilina e cloranfenicol (10,5%) e cefalotina (5,3%), enquanto as estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivo foram resistentes a amicacina (18%) e

vancomicina (18%). O leite in natura, além de apresentar qualidade microbiológica insatisfatória, colocando em risco a saúde dos consumidores, pode servir de veículo de disseminação de bactérias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Escherichia coli* / toxiinfecção alimentar / patógenos / resistência microbiana / segurança alimentar

CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LA LECHE FRESCA COMERCIALIZADO EN CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Gleyde Córdova da França Santos, Aura Lacerda Crepaldi, Rebeca Ayala Rosa dos Santos, Norma Suely Evangelista Barreto e Márcia Luciana Cazetta

RESUMEN – Con el fin de evaluar la calidad microbiológica de la leche cruda y la susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos bacterianos se obtuvieron de 25 muestras de leche para la cuantificación de los microorganismos, mesófilos, psicrotrofos, levaduras y mohos, *Staphylococcus* spp. Estafilococo coagulasa positivos, coliformes (35°C y 45°C) y *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. El promedio del recuento de microorganismos mesófilos fue de $1,6 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, psicotrópicas $9,6 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, levaduras y mohos $3,8 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, coliformes a 35° C 4×10^5 NMP.mL⁻¹ y 45°C $3,8 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹. No fue la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positivos en el 44% de las muestras, con un promedio de $7,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ y *Escherichia coli* en el 76% de las muestras. No hubo detección de *Salmonella* en ninguna de las muestras. *Escherichia coli* fue resistente a la tetraciclina (57,9%), ampicilina y el cloranfenicol (10,5%) y cefalotina (5,3%), mientras que las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos fueron resistentes a amikacina (18%) y vancomicina (18 %). La leche fresca, además de presentar calidad microbiológica satisfactoria, poniendo en peligro la salud de los consumidores, puede servir como un vehículo para la difusión de bacterias resistentes a los diferentes agentes antimicrobianos.

PALABRAS CLAVE / *Escherichia coli* / enfermedades alimentar / patógenos / resistencia microbiana / la seguridad alimentaria

Introdução

O leite é um alimento de elevado valor nutricional, que tem grande importância na dieta da população, todas as faixas etárias e classes sociais. Devido à sua riqueza de nutrientes, incluindo as proteínas, os carboidratos e os sais minerais é propício ao desenvolvimento de uma grande variedade de microorganismos (Timm et al., 2003), principalmente aqueles patogênicos ao homem.

A contaminação inicial do leite in natura interfere diretamente na sua qualidade, bem como o tempo e temperatura de exposição desde a ordenha até o consumidor. Deficiências no manejo e higiene na ordenha, mastite, mão-de-obra desqualificada, comercialização à temperatura ambiente e em recipientes mal sanitizados fazem deste alimento um perigo à saúde dos consumidores, em virtude de algumas pessoas terem por hábito a ingestão de leite sem tratamento térmico. Este quadro contribui para que o leite in natura no Brasil seja de má qualidade, quando comparado a países mais desenvolvidos (Santana et al., 2001; Santos, 2007).

O consumo de leite sem tratamento prévio, como a pasteurização, expõe a população à diversas doenças como a tuberculose e a brucelose (Germano e Germano, 2008), além de não assegurar a distribuição de um produto inócuo. Para ser considerado de qualidade, o leite precisa ter qualidade sensorial, nutricional e físico-química, bem como contagem reduzida de células somáticas e baixa carga microbiana (Zocche et al., 2002).

Apesar da comercialização do leite in natura ser considerada proibida pelos órgãos federais, em Cruz das Almas sabe-se que alguns estabelecimentos ainda comercializam esse alimento em virtude da elevada procura. Este fato se deve a crença popular de que esse leite é mais rico em nutrientes e mais “forte”. Por outro lado, o baixo custo estimula seu consumo principalmente pela população de baixa renda. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do leite in natura comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia, visando verificar a qualidade microbiológica do produto e a susceptibilidade das estirpes isoladas a agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

No período de abril a setembro de 2010 foram obtidas 25 amostras de leite in natura, sendo uma amostra por estabelecimento, em açougues, padarias, mini-mercados e supermercados de Cruz das Almas, Bahia. Nesses estabelecimentos, o leite foi acondicionado de várias maneiras: a temperatura ambiente em galões ou em sacos sobre balcões e em garrafas reutilizadas e refrigeradas (Figura 1). Em alguns estabelecimentos não foi possível verificar a forma de armazenamento, já que o produto ficava armazenado fora do alcance dos consumidores. As amostras foram adquiridas em volume de 1 L e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, do Núcleo de Estudos em Pesca e Aqüicultura (NEPA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) para a quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas e psicrotróficas aeróbias, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e 45°C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e presença de *Salmonella* e *Escherichia coli*. Todos os meios de cultura utilizados nas análises foram da marca Himedia.



Figura 1. Recipientes utilizados para acondicionamento do leite in natura vendido no comércio varejista em Cruz das Almas, Bahia.

Os padrões microbiológicos para o leite in natura foram considerados com base na Instrução Normativa Nº 51 (Brasil, 2002) já que a RDC N º12 (Brasil, 2001) não apresenta padrões microbiológicos para esse produto.

Para a contagem das bactérias heterotróficas mesófilas e psicrotróficas aeróbias, adicionou-se uma alíquota de 25 mL da amostra em 225 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, que foi homogeneizada e, a partir desta, realizadas diluições seriadas até 10^{-5} . Em seguida, alíquotas de 1 mL foram semeadas em duplicata em placas de Petri, contendo o meio Plate Count Agar (PCA). Utilizou-

se a técnica de pour plate (profundidade) para os mesófilos e de spread plate (superfície) para os psicrotópicos. Após a solidificação dos meios, as placas foram incubadas por 24 a 48 h a 35°C para mesófilos e a 10°C por até sete dias para os psicrotópicos. Decorrido esse período as placas contendo colônias entre 25 a 250 foram contadas usando contador de colônias (Phoenix - CP 600 Plus) (Silva et al., 2007).

Na contagem de bolores e leveduras, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas na superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose a 4% suplementado com cloranfenicol e incubado a 25°C±1 por cinco a sete dias.

A determinação de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada usando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos (Número Mais Provável - NMP), em três etapas distintas: prova presuntiva, prova confirmatória e prova bioquímica (Silva et al., 2007). Na prova presuntiva alíquotas de 1 mL da amostra foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLS) contendo tubos de Durhan invertidos e incubados por 48 h a 35°C. Considerou-se como resultado positivo a formação de gás nos tubos de Durhan e turvação do meio. Em seguida, inóculos oriundos dos tubos positivos foram transferidos para tubos contendo Caldo Lactose Bile Verde Brilhante (CBVB) e caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados respectivamente, a 35°C por 48 h e 45°C, em banho-maria, por 24 h. Os resultados foram expressos em NMP.mL⁻¹. Decorrido esse período, os tubos EC positivos foram semeados no meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35°C por 24 h. As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, foram isoladas em tubos de ensaio contendo Ágar Triptose Soja (TSA) inclinado e submetidas aos testes bioquímicos do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons).

A contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada por meio da técnica de espalhamento spread plate, usando alça de Drigalski. Inoculou-se 0,2 mL de cada diluição em Ágar Baird-Parker, em duplicata e incubou-se a 35°C, por 48 h. As colônias características de *Staphylococcus*, ou seja, colônias negras, circulares, brilhantes, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente foram submetidas aos testes de catalase e coagulase. Para a contagem presuntiva de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram selecionadas placas contendo de 20 a

200 colônias. Eventualmente, as colônias atípicas, porém suspeitas, também foram contadas (Silva et al., 2007). No teste de coagulase as colônias foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e incubados a 35°C por 24 h. Em seguida, 0,2 mL da suspensão foi transferido para tubos estéreis, adicionado de 0,5 mL de Plasma de Coelho e homogeneizado levemente com movimentos de rotação. Em seguida, observou-se a formação ou não de coágulo durante o intervalo de 6 h ou por até 24 h. Para o teste de catalase, foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionado uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% e observado o borbulhamento imediato. Na interpretação dos resultados considerou-se *Staphylococcus* coagulase positiva todas as culturas com reação de coagulase e catalase positivos. Para o cálculo, considerou-se o número de UFC.mL⁻¹ em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (Silva et al., 2010).

Para a pesquisa de *Salmonella*, inicialmente realizou-se o pré enriquecimento adicionando 25 mL da amostra em 225 mL de Caldo Lactose (CL) e incubado a 35°C por 24 h. Decorrido esse período, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram inoculadas em 10 mL de caldo Tetratonato (TT) e caldo Rappaport (RV), respectivamente e incubados por 24 h à 43°C e 42°C, em banho-maria. Dos tubos que apresentaram crescimento microbiano, alíquotas foram retiradas e estriadas nos meios seletivos Ágar MacConkey (colônias típicas caracterizam-se por serem incolores ou translúcidas levemente amareladas) Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (colônias típicas caracterizam-se por serem transparente com ou sem centro negro) e Ágar Verde Brilhante (BGA) (colônias típicas caracterizam-se por serem rosáceas a vermelhas) e incubadas por 24 h a 35°C. As colônias com morfologia característica de *Salmonella* foram então inoculadas em Ágar Ferro Açúcar Triplo (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), incubados por 24 h a 35°C. A partir do crescimento positivo (ácido na base e alcalino no ápice para Ágar TSI e alcalino com ou sem produção de gás para LIA) uma nova alíquota foi retirada e semeada em Ágar Triptona Soja (TSA), para posterior identificação bioquímica (urease, indol, fermentação de dulcitol, sacarose e lactose, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato e descarboxilação da lisina) e teste sorológico (Silva et al., 2007).

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em placa, seguindo a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Para a padronização do inóculo a ser utilizado no teste de resistência aos antibióticos, mediu-se a densidade óptica da cultura, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm (Wikler et al., 2005), com base na escala de MacFarland a 0,5 equivale que equivale a uma população de $10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹. Após o ajuste do inóculo, mergulhava-se um swab de algodão estéril na salina turva, pressionando-o firmemente contra a parede interna do tubo a fim de ser retirado o excesso e semeados em placas contendo Ágar Muller-Hinton. Decorridos cinco minutos, os discos de antibiótico foram fixados nas placas com auxílio de pinça estéril e incubadas a 37°C por 18 h. Em seguida, procedeu-se a medição dos halos de inibição (Tabela 2) medidos em milímetros com o uso de paquímetro digital.

Para os testes de sensibilidade foram selecionados treze antimicrobianos comerciais de acordo com o espectro de ação e classes de antimicrobianos (Tabela 1). Como controle utilizou-se uma estirpe de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

TABELA 1. Lista dos antibióticos utilizados na pesquisa relacionando-os às classes de antimicrobianos e seu sítio de ação.

Classes	Antibiótico	Sítio de Ação
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10µg (GEN)	Biossíntese de proteínas
	Amicacina 30 µg (AMI)	Biossíntese de proteínas
β-lactâmicos	Cefalotina 30 µg (CFL)	Biossíntese da parede bacteriana
	Ceftazidima 30 µg (CFZ)	Biossíntese da parede bacteriana
Cloranfenicol	Cloranfenicol 35µg (CLO)	Biossíntese de proteínas
Tetraciclina	Tetraciclina 30µg (TET)	Biossíntese de proteínas
Aminopenicilina	Ampicilina 10µg (AMP)	Biossíntese da parede bacteriana
Quinolonas	Ácido Nalidíxico 30µg (NAL)	Biossíntese de ácidos nucléicos
	Ciprofloxacino 5 µg (CIP)	Biossíntese do ADN-girase
Carbapenemas	Imipenem 10µg (IPM)	Biossíntese da parede bacteriana
Sulfonamidas	Sulfazotrim 25µg (SUT)	Biossíntese da via metabólica dos folatos
Nitrofuranos	Nitrofurantoína 300µg (NIT)	Redução enzimática
Vancomicina	Vancomicina 30 µg (VAN)	Biossíntese da parede bacteriana

Os perfis de resistência e sensibilidade foram estabelecidos de acordo com o Manual do fabricante dos discos de antimicrobianos (LABORCLIN, 2007), descritos na Tabela 2.

TABELA 2. Tabela com os valores dos intervalos dos halos de inibição.

Antibiótico	Resistente (\leq)	Intermediário	Sensível (\geq)
Gentamicina 10 μ g	12	13 – 14	15
Amicacina 30 μ g	14	15 – 16	17
Cefalotina 30 μ g	14	15 – 17	18
Tetraciclina 30 μ g	11	12 – 14	15
Ampicilina 10 μ g	13	14 – 16	17
Ceftazidima 30 μ g	14	15 – 17	18
Ácido Nalidíxico 30 μ g	13	14 – 18	19
Ciprofloxacino 5 μ g	15	16 – 20	21
Cloranfenicol 35 μ g	12	13 – 17	18
Imipenem 10 μ g	13	14 – 15	16
Sulfazotrim 25 μ g	10	11 – 15	16
Nitrofurantoína 300 μ g	14	15 – 16	17
Vancomicina 30 μ g	9	10 – 11	12

A presença ou ausência de plasmídios–R foi testada para as estirpes que apresentaram perfil de multi-resistência aos antimicrobianos testados. Como agente de cura foi utilizado o Acridine Orange (AO) na concentração de 100 μ g/mL. As estirpes foram crescidas em caldo Luria-Bertani (LB), + AO e incubadas por 24 h a 30°C em estufa bacteriológica. Após esse período de tempo procedeu-se o antibiograma para verificar se houve alteração no perfil de resistência aos antibióticos previamente testados (Molina-Aja et al., 2002).

O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana) foi utilizado para determinação da múltipla resistência dos micro-organismos. Este índice é definido como a/b, ou seja, o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente (a), dividido pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b), multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentual (Hirsch et al., 2006).

Delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi usado utilizando os estabelecimentos como tratamento e as amostragens como repetição, sendo o estabelecimento 01 (açougues), 02 (padarias), 03 (mini-mercados) e 04 (supermercados). Os resultados foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) por meio do programa Sisvar 5.1. Utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Foi observada elevada contagem microbiana em todas as amostras avaliadas, independente do estabelecimento em que foi obtido. Apesar dos açougues apresentarem as piores condições higiênicas, esse fato não foi suficiente para que as amostras apresentassem maior contaminação.

A contagem de bactérias heterotróficas mesófilas variou de $9,1 \times 10^5$ a $8,8 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ (Tabela 3), sendo a média por estabelecimento de $9,5 \times 10^7$ a $2,9 \times 10^9$ (UFC.mL⁻¹) (Tabela 4). Apesar dos micro-organismos mesófilos das amostras provenientes dos supermercados terem apresentado maior contaminação, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$). Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (IN 51) que limita valores de $7,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ para leite cru refrigerado. Esses micro-organismos são usados como bioindicadores de qualidade, visto que nesse grupo podem estar presentes bactérias patogênicas de origem alimentar (Mello, 2007). Melo et al. (2010) também relataram contagens de $1,8 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, em amostras de leite in natura obtidas no município de Major Isidoro, Alagoas.

Para os psicotróficos, em cinco amostras não foi observado crescimento microbiano, mas das amostras que apresentaram crescimento desse grupo, a contagem variou de $9,5 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ (Tabela 3). Quando verificada a contaminação por estabelecimento as amostras obtidas nas padarias apresentaram maior contagem microbiana ($2,6 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹), embora sem diferença significativa ($P > 0,05$) (Tabela 4). Pinto et al. (2006) analisando amostras de leite in natura de fornecedores de uma indústria de laticínios na Zona da Mata Mineira relataram maiores contagens de psicotróficos de $2,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ no leite coletado em tanques individuais em relação às contagens dessas bactérias nos tanques coletivos, que foi de $8,9 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

A grande problemática da elevada carga microbiana é que a ocorrência de atividade enzimática a partir de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ já é suficiente para comprometer as características do alimento, encurtando sua vida útil (Zocche et al., 2002).

Tabela 3. Quantificação microbiana do leite in natura obtido em diferentes estabelecimentos na cidade de Cruz das Almas, Bahia, 2010.

Contagem microbiana UFC.mL ⁻¹ ou NMP.mL ⁻¹							
Amostras	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
L1	$2,2 \times 10^6$	SC	$1,03 \times 10^5$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^6$	SC
L2	$3,8 \times 10^6$	$2,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$9,3 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,8 \times 10^7$	$5,4 \times 10^6$
L3	$3,4 \times 10^8$	$3,4 \times 10^3$	$4,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$
L4	$3,7 \times 10^8$	$3,1 \times 10^3$	$4,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	$8,7 \times 10^3$
L5	$1,7 \times 10^6$	SC	$3,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	SC
L6	$1,5 \times 10^6$	SC	$8,8 \times 10^8$	$>1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	SC
L7	$4,4 \times 10^9$	SC	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	SC
L8	$3,2 \times 10^7$	SC	$1,4 \times 10^7$	$3,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$3,0 \times 10^7$	SC
L9	$4,2 \times 10^8$	$6,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^9$	$>1,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	SC
L10	$1,3 \times 10^9$	$2,9 \times 10^3$	$7,0 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^1$	$5,0 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$
L11	$5,0 \times 10^9$	$5,4 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^1$	$3,0 \times 10^5$	SC
L12	$3,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3$
L13	$5,7 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$7,2 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	SC
L14	$6,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	SC
L15	$2,8 \times 10^9$	$6,6 \times 10^4$	$3,1 \times 10^9$	$>1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^7$	$6,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
L16	$1,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^7$	SC
L17	$6,7 \times 10^9$	$1,5 \times 10^6$	$3,3 \times 10^9$	$>1,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	SC
L18	$8,8 \times 10^9$	$1,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^9$	$9,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$5,2 \times 10^4$	SC
L19	$1,2 \times 10^9$	$5,9 \times 10^3$	$3,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$9,3 \times 10^3$	$6,5 \times 10^5$	SC
L20	$5,5 \times 10^9$	$9,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^1$	$3,5 \times 10^4$	SC
L21	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$
L22	$7,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
L23	$9,1 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$	$4,8 \times 10^6$	$4,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$	$4,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
L24	$4,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
L25	$4,1 \times 10^8$	$6,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$

SC = sem crescimento. L = Leite. UFC = Unidades Formadoras de Colônias. NMP = Número Mais Provável.

Tabela 4. Média da contagem microbiana no leite in natura obtido em diferentes estabelecimentos em Cruz das Almas - Bahia.

Estabelecimentos	Contagem microbiana UFC.mL ⁻¹ ou NMP.mL ⁻¹					
	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
01	9,5 x 10 ⁷ a	1,5 x 10 ³ a	1,5 x 10 ⁷ a	1,3 x 10 ⁴ b	2,8 x 10 ⁵ a	2,9 x 10 ⁶ a
02	1,8 x 10 ⁹ a	2,6 x 10 ⁵ a	9,4 x 10 ⁸ a	8,6 x 10 ⁵ a	1,0x 10 ⁶ a	5,9 x 10 ⁴ b
03	1,6 x 10 ⁹ a	3,8 x 10 ⁴ a	1,1 x 10 ⁸ a	2,4 x 10 ⁵ ab	2,0 x 10 ⁴ a	3,9 x 10 ³ b
04	2,9 x 10 ⁹ a	8,7 x 10 ⁴ a	4,7 x 10 ⁸ a	4,9 x 10 ⁵ ab	1,9 x 10 ⁵ a	4,7 x 10 ³ b

Obs: Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05). Estabelecimentos 01 – açougue; 02 – padaria; 03 – mini-mercados e 04 - supermercados.

UFC = Unidades Formadoras de Colônias. NMP = Número Mais Provável.

A presença de bolores e leveduras nas amostras de leite variaram de 1,1 x 10⁴ a 3,3 x 10⁹ UFC.mL⁻¹ (Tabela 3), sendo a maior contaminação observada nas amostras provenientes das padarias (9,4 x 10⁸ UFC.mL⁻¹) (Tabela 4), embora sem diferença significativa (P>0,05) entre os estabelecimentos. Torkar e Vengust (2008), avaliando 60 amostras de leite in natura detectaram bolores e leveduras, respectivamente, em 95% e 63,3% das amostras. Apesar de não haver padrões microbiológicos na legislação brasileira para estes micro-organismos, sua presença no leite representa riscos à saúde pública em virtude de algumas linhagens de fungos serem patogênicas ao homem.

A quantificação de coliformes a 35°C variou de 9,3 x 10² a >1,1 x 10⁶ NMP.mL⁻¹ e a 45°C de 1,5 x 10¹ a >1,1 x 10⁷ NMP.mL⁻¹ (Tabela 3). Por estabelecimento a média para os coliformes a 35°C foi de 1,3 x 10⁴ a 8,6 x 10⁵ NMP.mL⁻¹, sendo que houve diferença significativa dos micro-organismos das amostras oriundas da padaria em relação aos demais estabelecimentos (P>0,05). Para os coliformes a 45°C, houve variação de 2,0 x 10⁴ a 1,0 x 10⁶ NMP.mL⁻¹, nesse caso, sem diferença significativa (P>0,05) entre a contagem das amostras dos estabelecimentos. O leite vendido nas padarias foi o mais contaminado (Tabela 4). A presença de coliformes acima de 10³ NMP.mL⁻¹ é considerado um indicativo de higiene deficitária na obtenção do produto, e elevada contagem de coliformes a 35°C no alimento indica a presença de bactérias como *Klebsiella*,

Serratia, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, dentre outras, responsáveis por causarem quadros de gastroenterites (Citadin et al., 2009).

Escherichia coli foi encontrada em 19 (76%) amostras de leite. Apesar de *E. coli* não patogênica prevalecer no trato digestivo dos bovinos (Laven et al., 2003), sua presença no leite é um bioindicador da presença de bactérias patogênicas que alteram a qualidade do produto colocando em risco a saúde dos consumidores (Lacerda et al., 2009).

As contagens de *Staphylococcus* spp. variaram de $1,0 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Lamaita et al. (2005) ao encontrarem alta população de *Staphylococcus* spp. ($1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹) em leite in natura estocado em tanques refrigerados de 80 propriedades rurais, em Minas Gerais. *Staphylococcus* coagulase positiva foi identificado em 44% das amostras, sendo a maior média ($2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹), observada nas amostras dos açougues (Tabela 4), com diferença significativa ($P > 0,05$) entre os estabelecimentos. Nos açougues, onde as amostras foram coletadas, observou-se condições higiênico-sanitárias precárias, com presença de insetos, restos de sangue dos animais abatidos, comercialização simultânea de carne e leite e manipulação de dinheiro.

Embora o Ministério da Saúde não estabeleça padrão microbiológico para *Staphylococcus* coagulase positiva no leite in natura, a presença desse patógeno nos alimentos a partir de $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ é considerada alta (Borges et al., 2008). Contagens de *Staphylococcus* spp. da ordem de 10^5 - 10^6 UFC.mL⁻¹ têm importância epidemiológica por propiciar a intoxicação alimentar (Carmo et al., 2002). Franco e Landgraf (2003) relataram que 0,375 µg da enterotoxina estafilocócica / Kg corpóreo é suficiente para causar um quadro de intoxicação.

Salmonella spp. não foi encontrada nas amostras de leite analisadas. Esse resultado corrobora com os encontrados por Oliveira (2005), ao estudarem amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP. Embora não tenha sido detectada a presença de *Salmonella* nas amostras, Pinto et al. (2006) advertem que elevada carga de outros micro-organismos no leite in natura ressalta falhas graves de higiene na obtenção, armazenamento, distribuição e comercialização do alimento.

Em Cruz das Almas, uma falha encontrada na comercialização do leite in natura, é que na maioria dos casos, o produto é obtido em recipientes de plástico,

muitos deles reutilizados e mal higienizados (Figura 1). O armazenamento do produto é realizado de diferentes formas, nos estabelecimentos onde foram coletados para as análises. Algumas vezes, o produto foi encontrado armazenado em latões à temperatura ambiente. Em um dos estabelecimentos o leite se encontrava embalado em saco plástico de 1 litro e exposto dentro de um cesto, em cima da bancada. A utilização desses recipientes aliado a falta de refrigeração contribuem para o aumento da carga microbiana do alimento, comprometendo sua qualidade. A baixa qualidade do leite nesse estudo demonstra a necessidade de adoção de práticas higiênicas em toda a cadeia produtiva, bem como de conscientização dessas práticas pelos produtores, principalmente aqueles de pequeno e médio porte que apresentam baixa escolaridade e tudo o que sabem foi passado de geração em geração.

Apesar da comercialização do leite in natura ser legalmente proibida, a falta de fiscalização pelos órgãos competentes não tem impedido o mercado informal do alimento, e o que se observa é a comercialização de um produto de péssima qualidade, que não oferece segurança aos consumidores. Por outro lado, a falta de estrutura nas propriedades leiteiras, sem um laticínio que possa receber o leite, faz com que os produtores comercializem o produto sem tratamento térmico, no comércio local ou diretamente com os consumidores.

Os testes de resistência antimicrobiana foram realizados com 19 estirpes de *E. coli* e 11 de *Staphylococcus coagulase positiva* (Figuras 2 e 3). Para o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para *E. coli* usou-se nove antibióticos (ampicilina, imipenem, cefalotina, gentamicina, amicacina, nitrofurantoína, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico) que são eficientes em bactérias Gram-negativas. Desses, os isolados apresentaram resistência intermediária a seis antibióticos (ácido nalidíxico, amicacina, gentamicina, nitrofurantoína, cefalotina e imipenem), indicando um provável caminho para a resistência.

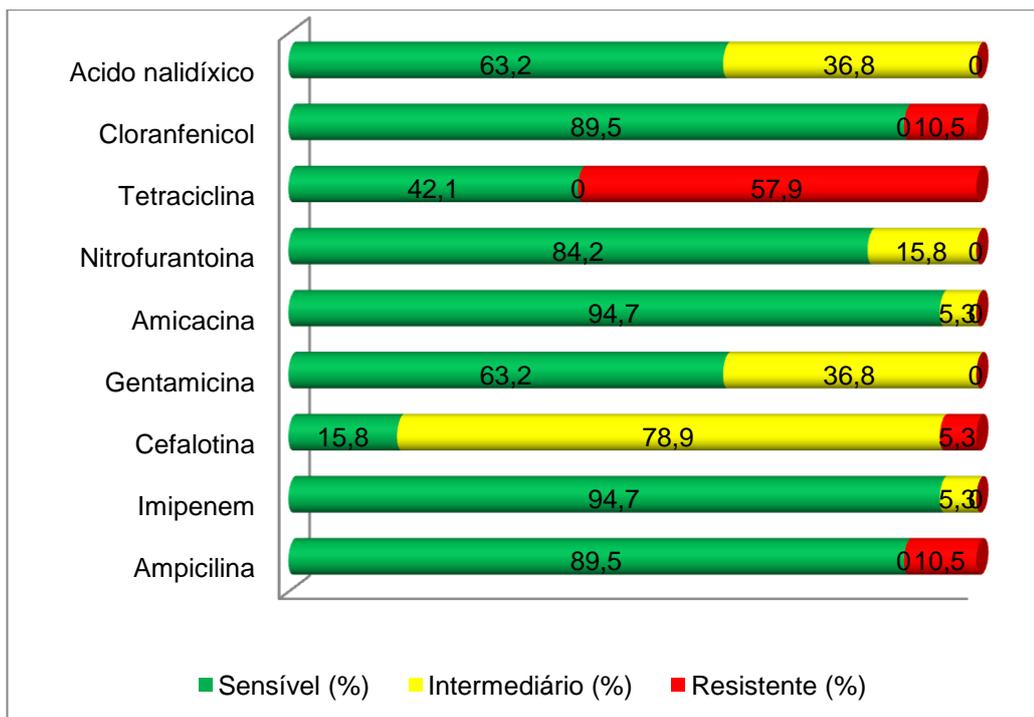


Figura 2. Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli*, isoladas das amostras de leite in natura comercializado em Cruz das Almas, Bahia.

Resistência intermediária foi observada em 36,8 % das estirpes de *E. coli*, frente ao ácido nalidíxico (quinolona de primeira geração). A resistência pode ter origem cromossômica, resultando de um processo de mutação em uma ou duas etapas, manifestando-se pela existência de um ADN-girases modificadas que não sofrem inibição pela droga. Além disso, a resistência pode ser devido tanto de modificações nos canais porínicos da membrana externa das bactérias diminuindo a difusão das drogas para o interior das células como também a um possível mecanismo de efluxo que retira a droga do interior da célula bacteriana (Tavares, 2009).

O grupo dos aminoglicosídeos é muito utilizado no tratamento de infecções bacterianas desde 1960, como nas enterites e mastites (Bogialli et al., 2005). Dentre esse grupo, está a gentamicina, um antibiótico comumente usado como agente terapêutico (Prescott, 2000) contra às enterobactérias (Cruz, 2009). Neste estudo, *E. coli* apresentou resistência intermediária em 36,8% dos isolados. A resistência bacteriana a esse fármaco é adquirida principalmente pela transferência de fatores R pelo processo de conjugação, sendo a resistência por

mutação muito rara (Tavares, 2001). Em relação à amicacina, 5,3% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a este antimicrobiano. Essa resistência pode estar atribuída à aquisição de plasmídios conjugativos, contendo genes de resistência, os quais, habitualmente, conferem resistência múltipla, envolvendo ao mesmo tempo vários antibióticos aminoglicosídeos (Tavares, 2009).

Dos antimicrobianos testados observou-se que se somado o perfil de resistência intermediária e resistência todas as estirpes apresentaram resistência a pelo menos um dos nove antimicrobianos testados, sendo a maior resistência observada à tetraciclina (57,9%) (Figura 2). Este fato sugere que os animais aos serem tratados não estariam passando pelo período de quarentena (referente ao início do tratamento com o antibiótico até a ordenha), necessário a eliminação da droga pelo organismo.

A resistência adquirida às tetraciclinas pode ser devida a alterações cromossômicas resultantes de mutação ou adquirida pela transferência de plasmídios R, principalmente em bacilos Gram-negativos entéricos (Cruz, 2009) e transposons, sendo esta a mais frequente. A resistência se manifesta principalmente por alterações no sistema de transporte da célula, o que impede a alteração do antibiótico no seu interior (Tavares, 2009).

Resistência ao cloranfenicol também foi verificada em 10,5% das estirpes de *E. coli*. Apesar de seu uso ter sido proibido a partir da instrução normativa N° 9 (Brasil, 2003), ainda ocorre uso indiscriminado do mesmo. Além disso, a resistência pode ser devido ao fato de que algumas enterobactérias produzem a enzima cloranfenicol-acetiltransferase que catalisa a acetilação do cloranfenicol, levando à formação de metabólitos inativos. Também pode estar relacionada ao fato de haver permeabilidade reduzida da membrana celular bacteriana, capacidade alterada de ligação na subunidade ribossômica 30S e inativação por nitrorredutases (Reviere e Papich, 2003).

Todos os isolados de *E. coli* apresentaram perfil de resistência intermediária ou resistência aos antibióticos da família dos β -lactâmicos. Resistência intermediária e resistência à cefalotina em 78,9 e 5,3%, respectivamente, resistência à ampicilina em 10,5% e ao imipenem em 5,3% das estirpes. A resistência aos β -lactâmicos pode ocorrer em virtude de sua ampla utilização no tratamento de infecções no gado leiteiro e em vacas em lactação (Costa, 2002). Segundo Andrade (2002) grande parte dos bacilos Gram-negativos aeróbicos e

anaeróbicos são naturalmente resistentes a esse grupo de antibióticos devido à produção das β -lactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico (Trabulsi et al., 2005).

Para avaliar o perfil de susceptibilidade pelas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva, foi utilizado oito antimicrobianos (sulfazotrim, vancomicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, tetraciclina, nitrofurantoína, amicadina e ceftazidima). Susceptibilidade foi observada em 100% das estirpes frente o sulfazotrim, ciprofloxacino, tetraciclina e ceftazidima (Figura 3).

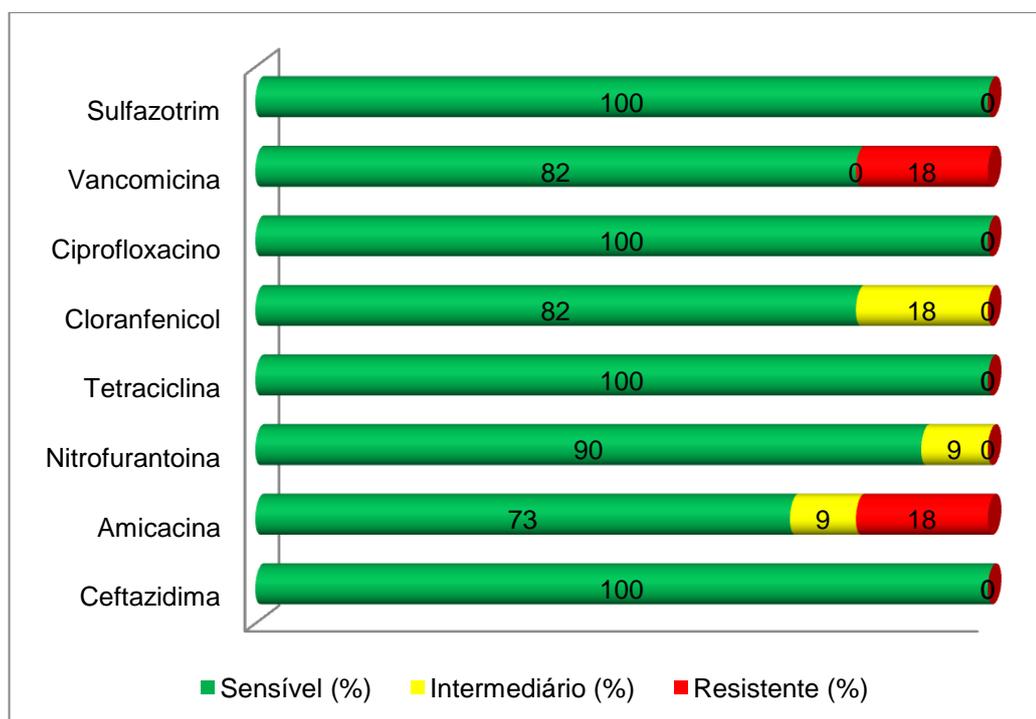


Figura 3. Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados de amostras de leite in natura comercializado em Cruz das Almas, Bahia.

O grupo das sulfonamidas (sulfazotrim) caracterizam-se por serem drogas essencialmente bacteriostáticas. Atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas (Tavares, 2009). Resistência intermediária a nitrofurantoína foi observada tanto para *E. coli* como em *Staphylococcus* coagulase positiva. Antibióticos deste grupo têm como característica o combate a doenças infecciosas tanto no homem como em animais, sendo farmacologicamente ativo contra bactérias e protozoários. Porém, apesar de sua eficiência, este

antimicrobiano não está autorizado no tratamento de animais destinados à produção de alimentos devido ao seu comprovado efeito cancerígeno (Santos, 2009).

Susceptibilidade à tetraciclina foi observada nas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva. Esse resultado pode ser em resposta do fato deste antibiótico ter efeito bacteriostático de amplo espectro (Andrade, 2002), sendo muito utilizada devido ao baixo custo e à facilidade de obtenção (Gonçalves e Andreatti Filho, 2010).

Elevado perfil de susceptibilidade ao também observado em 82% das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva frente ao cloranfenicol. O cloranfenicol é um antibiótico de ação bacteriostática, sendo que a resistência bacteriana a este agente pode ocorrer por impermeabilidade do sistema de membranas (Tavares, 2001).

Embora 82% das estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva serem susceptíveis, resistência à vancomicina em 18% delas é presumível, devido à resistência adquirida há algumas décadas a este antimicrobiano. Por isso, a vancomicina tornou-se uma das últimas opções terapêuticas contra bactérias multirresistentes, o que fez com que sua aplicação na medicina veterinária fosse proibida (Cruz, 2009). De ação bactericida, atua contra bactérias Gram-positivas, impedindo a síntese da parede celular bacteriana pela inibição da liberação de um polímero da membrana celular (Andrade, 2002).

Os resultados do índice MAR (Múltipla Resistência a Antimicrobianos) para os 11 isolados de *E. coli* mostraram que sete estirpes apresentaram índice MAR igual a 22%, ou seja, resistência a dois antimicrobianos, enquanto dos quatro isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, o índice foi de 12,5%, sem perfil de multiressistência (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) e perfil de resistência plasmidial de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite in natura, obtido no comércio varejista de Cruz das Almas, Bahia.

Cepa	Antimicrobianos	MAR (%)	Resistência Plasmidial
Ec 2	TET – CFL	22,22	-
Ec 7	AMP – TET	22,22	AMP – TET
Ec 8	TET	22,22	TET
Ec 9	TET	11,11	-
Ec 11	TET	11,11	-
Ec 12	TET	11,11	-
Ec 13	TET	11,11	-
Ec 14	AMP – TET	22,22	-
Ec 17	TET	22,22	TET
Ec 18	CLO – TET	22,22	CLO – TET
Ec 19	CLO – TET	22,22	-
Sc+ 10	AMI	12,5	-
Sc+ 23	VAN	12,5	-
Sc+ 25	AMI	12,5	-

Ec = *E. coli*; Sc+ = *Staphylococcus* coag. +. TET = tetraciclina; AMP = ampicilina; CFL = cloranfenicol; VAN = vancomicina; AMI = amicacina.

Quando avaliado se o perfil de multirresistência dos isolados ocorreu devido a mutações cromossômicas ou plasmidial, foi observado que em 57% das estirpes de *E. coli* a resistência ocorreu pela transferência de plasmídio (Tabela 5). Os plasmídios contêm genes de resistência que podem se replicar independentemente do cromossomo hospedeiro, sendo distinguidos por sua origem e repetição, onde uma única bactéria pode abrigar múltiplos plasmídios (Alekshun & Levy, 2007). Já a resistência cromossômica depende de mutação espontânea, evento raro e dirigida quase sempre a uma só droga. Os genes são transferidos com frequência relativamente baixa e o seu impacto clínico é menor que o da resistência plasmidial (Figueirêdo, 2008).

O aumento da resistência está relacionado ao uso abusivo de antibióticos, embora atualmente os órgãos competentes venham tentando controlar mais efetivamente a utilização dessas drogas pela população. Segundo Freitas et al. (2004) os antimicrobianos têm ação destrutiva nas células bacterianas, e o

surgimento de resistência múltipla aos antibióticos, representa um risco potencial à saúde pública podendo dificultar o tratamento de doenças humanas e animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis.

Considerações Finais

O leite in natura comercializado em Cruz das Almas apresenta elevada carga microbiana, que podem servir de veículo para surtos de toxiinfecções alimentares. Por outro lado, o perfil de resistência a gentamicina e vancomicina nas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva e multirresistência nas cepas de *E. coli* demonstram o risco potencial na disseminação de micro-organismos resistentes a diversas drogas na população usuária desse alimento, na ausência de tratamento térmico.

Referências Bibliográficas

- ALEKSHUN MN, LEVY BS (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128: 1037-1050.
- ANDRADE SP (2002) *Manual de terapêutica veterinária. 2.ed. São Paulo: Rocca, 697p.*
- APPELBAUM PC, HUNTER PA (2000) Review. The Fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16: 5-15.
- BOGIALLI S, CURINI R, DI CORCIA A, et al. (2005) Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1067: 93–100.
- BORGES MF, NASSU RT, PEREIRA JL, ANDRADE APC, KUAYE AY (2008) Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural*, 38:1431-1438.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de set. 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta

- de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, 20 de set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de jun. de 2003. Dispõe sobre a proibição de fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. *Diário Oficial da União*, 30 jun. 2003. Seção 1, p.1-2.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Resolução – RDC nº 12, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de 2 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União*, 10 de jan. de 2001. Art. 4a, p.1-48.
- CARMO LS, DIAS RS, LINARDI VR, et al. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiology*, 19: 9-14.
- CITADIN AS, POZZA MSS, POZZA PC et al. (2009) Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10: 52-59.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2010) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne (PA): CLSI.
- COSTA EO, (2002) Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA HS, GÓRNIAC SL, BERNARDI MM, (Eds.). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3.ed. Guanabara Koogan. p.443-455.
- COSTA LC, BELÉM LF, SILVA PMF, (2010) Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais: prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 42: 175-180.
- CRUZ AR, *Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos*. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FIGUEIRÊDO FV, *Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de Salmonella spp isoladas de dois estuários do Estado do Ceará*,

- Brasil*. 2008. 54 p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- FRANCO BDGM, LANDGRAF M, DESTRO MT, et al. (2003) Foodborne diseases in Southern South América. In: MILIOTIS, M, BIER. *Journal International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker: New York, p.733–743.
- FREITAS MFL, MOTA RA, LEÃO AEDS, et al. (2004) Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56: 405–407.
- GERMANO PML, GERMANO MIS, (2008) *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 3.ed. São Paulo: Manole. 986p.
- GONÇALVES GAM, ANDREATTI FILHO RL, (2010) Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758) com colibacilose. *Arquivo do Instituto Biológico*, 77: 715-718.
- HIRSCH D, PEREIRA JUNIOR DJ, LOGATO PVR, et al. (2006) Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. *Ciência Agrotécnica*, 30: 1211-1217.
- LACERDA LM, MOTA RA, SENA MJ, (2009) Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. *Arquivo do Instituto Biológico*, 76: 569-575.
- LAMAITA HC, CERQUEIRA MMOP, CARMO LS, et al. (2005) Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57: 702-709.
- LAVEN R A, ASHMORE A, STEWART CS, (2003) *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157. *Veterinary Journal*, 165: 78-83.
- MELLO VF. *Aplicação do sistema de gestão de segurança de alimentos em uma indústria de bebidas orgânicas*. 2007, 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) – Instituto de Tecnologia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

- MELO BA, SANTOS TMC, BARBOSA YRS, et al. (2010) Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas. *Revista Verde*, 5: 01-05,.
- MITCHELL MA, (2006) Therapeutic review: enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 15: 66-69.
- MOLINA-AJA A, GARCÍA-GASCA A, ABREU-GROBOIS A, et al. (2002) Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, 213: 7-12.
- OLIVEIRA RP. *Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no Município de Piracicaba - SP*. 2005, 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PETRI JR WA, (2001) Penicillins, Cephalosporins, and other - Lactam Antibiotics. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10.ed. New York: McGraw Hill, 2148p.
- PINTO CLO, MARTINS ML, VANETTI MCD, (2006) Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26: 645-651.
- PRESCOTT JF, (2000) Aminoglycosides and aminocyclitols. In: PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3.ed., Iowa State University Press, Ames, IA, p. 191–228.
- RAPINI LS, TEIXEIRA JP, MARTINS NE, et al. (2003) Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. *Revista Higiene Alimentar*, 17: 162.
- ROBBERS JE, SPEEDIE MK, TYLER VE, (1997) *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. Baltimore: Editorial Premier, 372 p.
- SANTANA EHW, BELOTI V, BARROS MAF, et al. (2001) Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. *Ciências Agrárias*, 22: 145-154,.
- SANTOS MV, FONSECA LFL, (2007) *Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri: Manole Ltda, 314p.
- SANTOS EVAC. *Controlo de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos animais de produção e seus derivados. Comparação dos diferentes cenários na União Européia*. 2009, 55 p. Dissertação (Mestrado em Medicina

Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

- SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA, et al. (2007) *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3.ed. São Paulo: Varela, 536p.
- SPINOSA HS, GÓRNIAC SL, BERNARDI MM, (2002) *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 752p.
- TAVARES W, (2001) *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1216p.
- TAVARES W, (2009) *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 599p.
- TIMM CD, (2003) Avaliação da qualidade microbiológica do leite Pasteurizado integral, produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, 17: 100-104.
- TORKAR KG, VENGUST A, (2008) The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M-1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, 19: 570-577.
- TRABULSI LR, ALTERTHUM S, GOMPERTZ OS, et al. (2005) *Microbiologia*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 586p.
- WIKLER MA, et al. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth Informational Supplement*. Wayne, Pensilvânia: Clinical and laboratory Standards Institute, 2005.
- ZOCHE F, BESORT LS, BARCELLOS VC, et al. (2002) Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo produzido na região oeste do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, 7: 59-67.

CAPÍTULO 3

Queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas – Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana

A ser enviado para a revista Ciência Agronômica – UFC

Queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas - Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana

Cheese curd and northern cheese sold in the north Cruz das Almas - Bahia:
microbiological and antimicrobial susceptibility

Gleyde Córdova da França Santos*, Jeferson dos Santos de Souza, Norma Suely Evangelista Barreto e Márcia Luciana Cazetta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), Rua Rui Barbosa, nº 710, Centro, CEP: 44.380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Email: gleydecordova@yahoo.com.br, jeferson.pesca@gmail.com, nsevangelista@yahoo.com.br, malulz@yahoo.com.br.

Resumo – Com o objetivo de analisar a qualidade microbiológica do queijo de coalho e requeijão do norte foram coletadas 10 e 14 amostras, respectivamente e quantificadas o número de micro-organismos mesófilos, bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 35°C e 45°C, *Escherichia coli* e presença de *Salmonella* spp. Contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva foi observada em 80% do queijo de coalho e 7% do requeijão do norte, com média de $1,5 \times 10^6$ e $8,3 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Micro-organismos mesófilos apresentaram contagem média de $1,9 \times 10^9$ e $2,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹, bolores e leveduras $3,1 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, coliformes a 35°C $1,1 \times 10^6$ e $4,4 \times 10^4$ NMP.g⁻¹, a 45°C $1,1 \times 10^5$ e $9,5 \times 10^2$ NMP.g⁻¹ e *Escherichia coli* em 50 e 7% das amostras de queijo de coalho e requeijão do norte, respectivamente. Não foi observada a presença de *Salmonella*. *Escherichia coli* apresentou resistência a ampicilina (16,7%) e imipenem (16,7%), enquanto *Staphylococcus* coagulase positiva foi resistente a nitrofurantoína (55,6%), tetraciclina (88,9%) e vancomicina (77,7%). Os queijos analisados, além de apresentarem qualidade microbiológica insatisfatória, podem servir de veículo na disseminação de bactérias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave - Micro-organismos patogênicos. Antibióticos. Multirresistência. Segurança alimentar.

Abstract - In order to analyze the microbiological quality of cheese curd and northern cheese were collected 10 and 14 samples, respectively, and quantified the number of micro-organisms mesophiles, yeasts and molds, *Staphylococcus* coagulase positive, coliforms at 35°C and 45°C, *Escherichia coli* and presence of *Salmonella* spp. Contamination by *Staphylococcus* coagulase positive was observed in 80% of the cheese curd and 7% of the northern cheese, with an average of 1.5×10^6 and 8.3×10^3 UFC.g⁻¹, respectively. Mesophilic micro-organisms had average count of 1.9×10^9 and 2.6×10^8 UFC.g⁻¹, molds and yeasts 3.1×10^5 and 3.0×10^5 UFC.g⁻¹, coliforms at 35°C 1.1×10^6 and 4.4×10^4 NMP.g⁻¹, at 45°C 1.1×10^5 and 9.5×10^2 NMP.g⁻¹ and *Escherichia coli* in 50 and 7% of the samples of cheese curd and northern cheese, respectively. We did not observe the presence of *Salmonella*. *Escherichia coli* was resistant to ampicillin (16.7%) and imipenem (16.7%), whereas *Staphylococcus* coagulase positive were resistant to nitrofurantoin (55.6%), tetracycline (88.9%) and vancomycin (77.7%). The cheeses analyzed, in addition to having poor microbiological quality can serve as a vehicle in the spread of bacteria resistant to different antimicrobial agents.

Key words - Pathogenic microorganisms. Antibiotics. Multidrug resistance. Food security.

Introdução

O queijo de coalho e o requeijão do norte têm ampla aceitação comercial, fazendo parte do hábito alimentar da população nordestina. De acordo com a legislação brasileira é exigido o uso de leite pasteurizado na elaboração desses produtos (BRASIL, 2001b; AUGUSTO, 2003), embora o que se observa na produção artesanal do queijo é a utilização da matéria-prima in natura (BORGES et al., 2003). Esse fato, aliado a outros aspectos característicos da produção artesanal, contribuem para a obtenção de um alimento de qualidade duvidosa e elevada carga microbiana.

Os queijos apresentam uma microbiota bastante diversificada, podendo ser constituída de micro-organismos desejáveis e indesejáveis. Dentre os desejáveis destacam-se as bactérias ácido-lácticos (BAL) que compreendem 11 gêneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

Streptococcus, *Vagococcus* e *Weissella* (MOGENSEN et al., 2003). No entanto, micro-organismos indesejáveis deteriorantes e/ou patogênicos, a exemplo da *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp., também podem estar presentes em função de contaminações resultantes do processo de produção (NICOLAU et al., 2001; GUEDES NETO, 2004), principalmente quando realizado por pessoal não treinado.

A contaminação do queijo ocorre em virtude da matéria-prima de baixa qualidade, higienização inadequada dos manipuladores, equipamentos, utensílios e ambiente, presença de insetos, forma de armazenamento e/ou durante a comercialização. Além disso, a falta de padronização de qualidade também contribui para a deterioração e redução da validade comercial do produto, representando riscos para o consumidor.

O importante papel que os micro-organismos desempenham com relação à qualidade e conservação do queijo faz com que estudos microbiológicos sejam de grande importância a fim de verificar se a presença de micro-organismos compromete a integridade do alimento, do ponto de vista microbiológico. A partir destas avaliações é possível inferir quais são as condições de higiene em que o alimento foi produzido e comercializado, os riscos oferecidos à saúde do consumidor. Essa análise é indispensável ainda para verificar se os padrões e especificações microbiológicos para o alimento estão sendo atendidos adequadamente (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Em Cruz das Almas, observa-se a escassa fiscalização e controle sanitário na comercialização de queijos artesanais. Falhas de produção na elaboração desses produtos e no seu armazenamento põem em risco a saúde pública por se tratar de um alimento que é consumido sem nenhum tratamento adicional. Essa realidade precisa ser mudada, tanto para garantir alimentos seguros do ponto de vista microbiológico, como o aprimorando na elaboração dos mesmos. Por outro lado, os queijos podem veicular estirpes resistentes a agentes antimicrobianos, uma vez que o leite in natura utilizado como matéria-prima do queijo, pode conter micro-organismos resistentes a diferentes drogas em virtude da profilaxia em que o rebanho é submetido.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do queijo de coalho e requeijão do norte comercializados no município de Cruz das

Almas, Bahia, visando verificar as condições higiênico-sanitárias dos produtos, e a susceptibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas.

Material e Métodos

No período de outubro a dezembro de 2010 foram obtidas 24 amostras de 200g de queijo, sendo 10 de queijo de coalho e 14 de requeijão do norte, em feira livre, padarias e mini-mercados. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) para a quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e 45°C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e presença de *Salmonella*. Para a realização das análises foram utilizados os meios de cultura da marca Himedia.

As Figuras 1 e 2 ilustram as condições de estocagem das amostras de queijo no comércio varejista de Cruz das Almas.

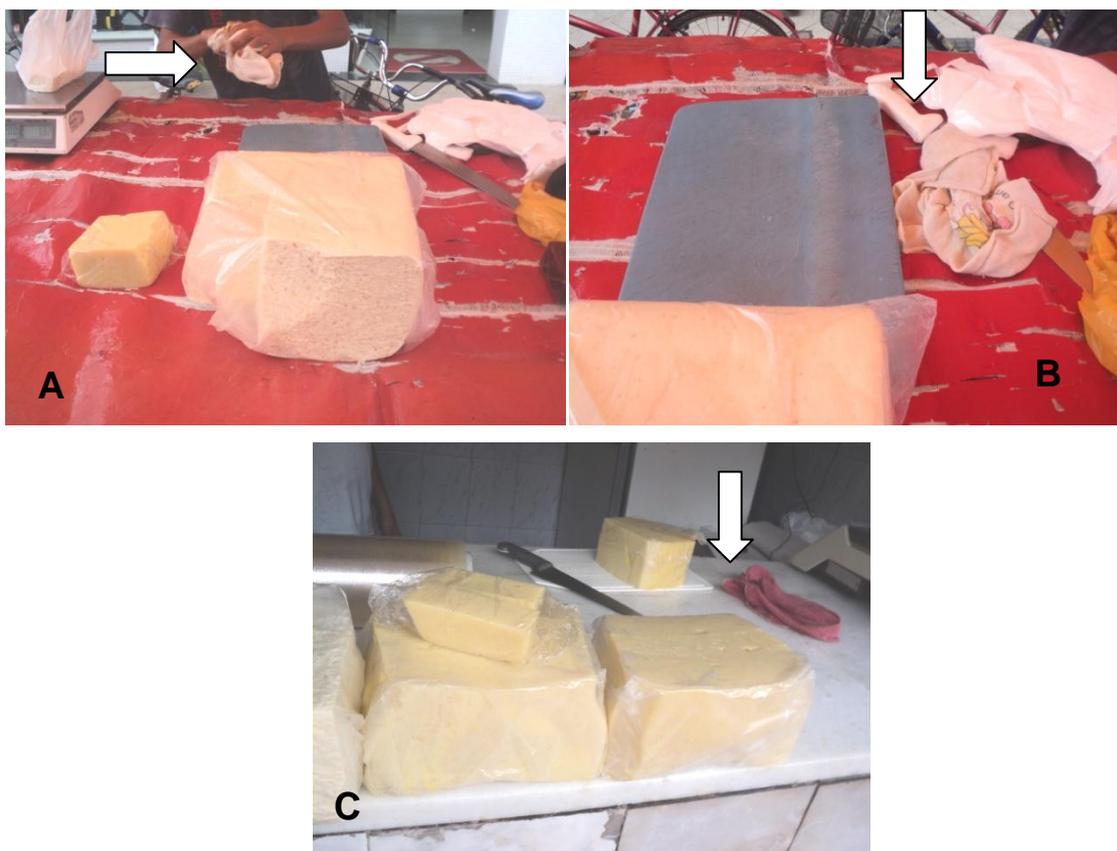


Figura 1. A - Utilização de flanela para higiene das mãos; B - mesma flanela (Figura A) em cima da faca utilizada para cortar o queijo; C – flanela utilizada para limpeza da bancada, próxima aos pedaços de queijos comercializados nos boxes do Mercado Municipal em Cruz das Almas, Bahia.



Figura 2. Foto visualizando as condições precárias da comercialização do queijo em um dos boxes do Mercado Municipal de Cruz das Almas, Bahia.

Para avaliação dos dados obtidos consultou-se a descrição dos padrões microbiológicos para queijos contidos na Instrução Normativa Nº 30 do

Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 2001b) e na RDC N °12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001a).

Contagem de bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias

Para a condução das análises, pesou-se 25g da amostra, que foi triturada e diluída em 225 mL de solução salina estéril a 0,85% de NaCl para então ser realizada diluições seriadas até 10^{-7} para o queijo de coalho e até 10^{-6} para o requeijão do norte. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram semeadas em placas de Petri em duplicata, contendo o meio Plate Count Agar (PCA), em profundidade. Após solidificação, as placas foram incubadas por 24 - 48 h a 35°C em estufa. Decorrido esse período, as placas contendo entre 25 a 250 colônias foram selecionadas e contadas usando contador de colônias (Phoenix - CP 600 Plus) (SILVA et al., 2007).

Contagem de bolores e leveduras

A partir das diluições, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose a 4%, suplementado com cloranfenicol, pela técnica de espalhamento em superfície, em duplicata e incubadas a 25°C±1 por cinco a sete dias (SILVA et al., 2007).

Determinação do grupo dos coliformes (NMP.g⁻¹)

A determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada usando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos em três etapas distintas: prova presuntiva, prova confirmatória e prova bioquímica (SILVA et al., 2007). Na prova presuntiva alíquotas de 1 mL da amostra foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLS) contendo tubos de Durhan invertidos e incubados por 48 h a 35°C. O resultado da prova foi confirmado por meio da formação de gás nos tubos de Durhan e turvação do meio. Em seguida, o inóculo oriundo dos tubos positivos foi transferido com auxílio de uma alça de níquel-cromo para tubos contendo Caldo Lactose Bile Verde Brilhante (CBVB) e caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados respectivamente, a 35°C por 48 h e 45°C, em banho-maria, por 24 h e os resultados expressos em NMP.mL⁻¹. Decorrido esse período, os tubos de EC positivos foram semeados no meio Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35°C por 24 h. O resultado positivo de cada série foi anotado, para posterior consulta à tabela de Hoskins.

As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, foram isoladas em tubos de ensaio contendo Ágar Triptose Soja (TSA) inclinado e incubados em estufa a 35°C por 24 h e, após esse período, as estirpes isoladas foram identificadas nos testes bioquímicos do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons).

Contagem de *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus coagulase positiva*

A contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizada por meio da técnica de espalhamento em superfície (spread plate), usando alça de Drigalski. Inoculou-se 0,2 mL de cada diluição em Ágar Baird-Parker, em duplicata, a 35°C por 48 h. As placas contendo de 20 a 200 colônias características de *Staphylococcus*, ou seja, colônias negras, circulares, brilhantes, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente foram selecionadas para a contagem. Eventualmente colônias atípicas, porém suspeitas, também foram contadas (SILVA et al., 2007).

No teste de coagulase as colônias típicas de *Staphylococcus coagulase positiva* foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e incubados a 35°C por 24 h. Em seguida, 0,2 mL da suspensão foi transferida para tubos estéreis, adicionado de 0,5 mL de Plasma de Coelho e homogeneizado levemente com movimentos de rotação. Em seguida, observou-se a formação (teste positivo) ou não (teste negativo) de coágulo durante um intervalo de 6 h a 24 h. Para o teste de catalase, foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionado uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% e observado borbulhamento imediato. Neste teste a enzima catalase desdobra o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ocorrendo liberação de gás (teste positivo) ou não (teste negativo) (LANCETTE; BENETT, 2001). Na interpretação dos resultados considerou-se *Staphylococcus coagulase positiva* todas as culturas com reação de coagulase e catalase positivos. Para o cálculo, considerou-se o número de UFC.g⁻¹ em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (SILVA et al., 2007).

Pesquisa de *Salmonella*

Inicialmente foi realizado o pré enriquecimento adicionando 25 g da amostra em 225 mL de Caldo Lactose (CL) simples (meio não seletivo, utilizado para

recuperar células injuriadas) que foi incubado a 35°C por 24 h. Decorrido esse período alíquotas de 1 mL e 0,1 mL eram inoculadas em 10 mL de caldo Tetrionato (TT) e caldo Rappaport (RV), respectivamente, e incubados por 24 h, à temperatura de 43°C e 42°C, em banho-maria. Nos tubos com crescimento microbiano, alíquotas foram retiradas com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e estriadas em placas de Petri contendo os meios seletivos Ágar MacConkey (colônias típicas nesse meio caracterizam-se por serem incolores ou translúcidas, levemente amareladas) Ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (colônias típicas nesse meio são transparente com ou sem centro negro) e Ágar Verde Brilhante (BGA) (colônias típicas nesse meio caracterizam-se por serem rosáceas a vermelhas) e incubadas por 24 h a 35°C. As colônias com morfologia característica de *Salmonella* foram então inoculadas em Ágar Ferro Açúcar Triplo (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), incubados por 24 h a 35°C. A partir do crescimento positivo nos tubos (ácido na base e alcalino no ápice no Ágar TSI e alcalino com ou sem produção de H₂S no Ágar LIA), uma nova alíquota foi retirada e semeada em Ágar Triptona Soja (TSA), para posterior identificação bioquímica (urease, indol, fermentação de dulcitol, sacarose e lactose, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato e descarboxilação da lisina) e testes sorológicos (SILVA et al., 2007).

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em placa (CLSI, 2005). Para a padronização do inóculo a ser utilizado no teste de resistência a antibióticos, mediu-se a densidade óptica da cultura, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm (WIKLER et al., 2005). Com base na escala de MacFarland, a densidade óptica igual a 0,5 equivale à população de 10⁷ – 10⁸ UFC.mL⁻¹. Após o ajuste do inóculo, mergulhou-se um swab de algodão estéril na salina turva, pressionando-o firmemente contra a parede interna do tubo a fim de ser retirado qualquer excesso e semeados nas placas contendo Ágar Muller-Hinton. Após cinco minutos, com o auxílio de uma pinça flambada, os discos de antibiótico foram fixados no meio e incubados a 37°C por 18 h. Em seguida, procedeu-se a medição dos halos de inibição em torno dos discos, com o uso de paquímetro digital. Os antimicrobianos testados de acordo com os grupos foram: β-lactâmicos – ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CFL), imipenem 10 µg (IPM) e ceftazidime 30 µg (CFZ); nitrofuranos –

nitrofurantoína 300 µg (NIT); quinolonas – ácido nalidíxico 30 µg (NAL) e ciprofloxacino 5 µg (CIP); tetraciclina – tetraciclina 30 µg (TET); fenicóis – cloranfenicol 30 µg (CLO); vancomicina – vancomicina 30 µg (VAN) e sulfonamidas – sulfazotrim 25 µg (SUT). Para controle foi utilizada as estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Cura do plasmídeo

Para avaliar a estabilidade do fenótipo do mecanismo de resistência, as estirpes com características de resistência foram submetidas à técnica de “cura” de plasmídeo (MOLINA-AJA et al., 2002), utilizando-se caldo Luria-Bertani (LB) e o agente mutagênico Acridine Orange (Sigma) na concentração de 100 µg/mL. Após incubação, por 24 h a 37°C as estirpes foram novamente expostas aos discos de antimicrobianos para avaliar se houve alteração no perfil de resistência da estirpe.

Múltipla resistência antimicrobiana

O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana) foi utilizado para determinação da múltipla resistência dos micro-organismos. Este índice é definido como a/b, ou seja, o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente (a), dividido pelo número de antibióticos aos quais o isolado foi exposto (b), multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentual (HIRSCH et al., 2006).

Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos ao teste ANOVA por meio do programa Sisvar 5.1 usando o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando os estabelecimentos como tratamento e as amostragens como repetição, sendo o estabelecimento 01 (feira livre), 02 (padarias) e 03 (mini-mercados).

Resultados e Discussão

Qualidade microbiana

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos de coalho e requeijão do norte estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

O resultado da contagem dos micro-organismos mesófilos no queijo de coalho variou de $1,6 \times 10^5$ a $3,5 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ (Tabela 1) sendo a média por estabelecimento de $1,5 \times 10^8$ a $1,9 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ (Tabela 3). Apesar das amostras

provenientes dos mini-mercados apresentarem maior contaminação, não houve diferença significativa entre os estabelecimentos ($P>0,05$). O número de mesófilos no requeijão do norte variou de $4,6 \times 10^5$ a $8,2 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (Tabela 2), sendo a média por estabelecimento de $6,7 \times 10^7$ a $2,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (Tabela 3). Nesse caso as amostras das padarias apresentaram maior contaminação, porém sem diferença significativa entre os estabelecimentos ($P>0,05$).

Tabela 1. Quantificação microbiana do queijo de coalho obtido em diferentes estabelecimentos na cidade de Cruz das Almas, Bahia, 2010.

Amostra	Contagem microbiana UFC.g ⁻¹ ou NMP.g ⁻¹					
	Mesófilos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
C1	$2,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
C2	$1,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$
C3	$4,2 \times 10^8$	$4,4 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^4$	$8,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$
C4	$1,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^4$	$7,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$
C5	$3,5 \times 10^9$	$6,0 \times 10^4$	$>1,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^8$	$2,0 \times 10^4$
C6	$5,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^8$	---
C7	$4,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^6$	$>1,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^4$
C8	$1,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^5$	$>1,1 \times 10^6$	$9,3 \times 10$	$1,1 \times 10^7$	---
C9	$6,9 \times 10^8$	7×10^3	$>1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10$	$4,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
C10	$5,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$	$>1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^3$	$8,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$

C = coalho

As contagens de bolores e leveduras para o queijo de coalho variaram de $1,1 \times 10^3$ a $3,1 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (Tabela 1) e a média por estabelecimento de $1,6 \times 10^4$ a $3,1 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (Tabela 3). As amostras da feira livre foram as que apresentaram maior contaminação. Para o requeijão do norte a contagem variou de $2,4 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (Tabela 3) e a média de $1,6 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (Tabela 3). Maior contaminação ocorreu na feira livre.

A pesquisa de bactérias mesófilas nos alimentos é muito importante visto que nesse grupo podem estar incluídas bactérias patogênicas de origem alimentar (MELLO, 2007), enquanto elevada contagem de bolores e leveduras ocasiona características de deterioração do produto que podem levar à sua rejeição, além de representar risco à saúde pública devido à produção de micotoxinas por algumas espécies de bolores (SANTOS et al., 2008).

Tabela 2. Quantificação microbiana do requeijão do norte obtido em diferentes estabelecimentos na cidade de Cruz das Almas, Bahia, 2010.

Amostra	Contagem microbiana UFC.g ⁻¹ ou NMP.g ⁻¹					
	Mesófilos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
R1	6,4 x 10 ⁶	1,6 x 10 ³	2,3 x 10	<3,0	2,8 x 10 ⁵	---
R2	6,0 x 10 ⁶	2,5 x 10 ³	3,6	<3,0	4,1 x 10 ⁵	---
R3	2,5 x 10 ⁷	5,1 x 10 ²	4,3 x 10 ²	<3,0	3,6 x 10 ³	---
R4	5,3 x 10 ⁶	2,4 x 10 ²	1,5 x 10 ²	<3,0	1,6 x 10 ³	---
R5	2,2 x 10 ⁶	2,2 x 10 ³	2,3 x 10	<3,0	4,6 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴
R6	4,6 x 10 ⁵	4,3 x 10 ³	9,3 x 10	3,6	2,8 x 10 ⁴	---
R7	7,2 x 10 ⁷	4,8 x 10 ³	4,3 x 10 ²	9,2	4,7 x 10 ⁴	---
R8	1,2 x 10 ⁸	4,0 x 10 ⁴	1,5 x 10	1,5 x 10	3,0 x 10 ⁵	---
R9	8,2 x 10 ⁸	3,1 x 10 ⁴	4,3 x 10 ²	<3,0	2,8 x 10 ³	---
R0	3,1 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁴	>1,1 x 10 ⁵	3,6	7,9 x 10 ⁴	---
R11	1,9 x 10 ⁸	4,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ²	1,5 x 10	5,3 x 10 ⁵	---
R12	2,1 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁴	4,3 x 10	3,6	3,4 x 10 ⁴	---
R13	2,4 x 10 ⁸	1,5 x 10 ⁶	>1,1 x 10 ⁵	9,2	6,8 x 10 ⁴	---
R14	3,1 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁴	>1,1 x 10 ⁵	2,3 x 10	5,7 x 10 ⁵	---

R = requeijão do norte

Tabela 3. Contagem média dos micro-organismos pesquisados no queijo de coalho e requeijão do norte por estabelecimentos em Cruz das Almas - Bahia.

Estabelecimentos	Média estatística da contagem microbiana UFC.g ⁻¹ ou NMP.g ⁻¹					
	Mesófilos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
Queijo de coalho						
01	1,5 x 10 ⁸ a	3,1 x 10 ⁵ a	7,0 x 10 ⁵ a	1,0 x 10 ⁴ a	1,8 x 10 ⁸ a	4,3 x 10 ⁵ a
02	9,4 x 10 ⁸ a	1,9 x 10 ⁴ a	1,1 x 10 ⁶ a	1,5 x 10 ⁴ a	1,8 x 10 ⁷ a	1,5 x 10 ⁶ a
03	1,9 x 10 ⁹ a	1,6 x 10 ⁴ a	1,1 x 10 ⁶ a	1,1 x 10 ⁵ a	7,8 x 10 ⁷ a	4,0 x 10 ⁴ a
Requeijão do norte						
01	7,5 x 10 ⁷ a	3,0 x 10 ⁵ a	4,4 x 10 ⁴ a	4,4 x 10 ² a	1,7 x 10 ⁵ a	0a
02	2,6 x 10 ⁸ a	1,9 x 10 ⁴ a	2,2 x 10 ⁴ a	9,5 x 10 ² a	1,8 x 10 ⁵ a	0a
03	6,7 x 10 ⁷ a	1,6 x 10 ⁴ a	1,6 x 10 ² a	7,7a	1,6 x 10 ⁵ a	8,3 x 10 ³ a

Obs: Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05). Estabelecimentos: 01 feira livre; 02 – padaria e 03 – mini-mercados. UFC = Unidades Formadoras de Colônias. NMP = Número Mais Provável.

As contagens obtidas para coliformes a 35°C em queijo de coalho variaram de 1,1 x 10⁶ a >1,1 x 10⁶ NMP.g⁻¹ (Tabela 1) destacando-se as padarias e os mini-

mercados com média superior ($1,1 \times 10^6$ NMP.g⁻¹) em relação às amostras da feira livre (Tabela 3). Já o requeijão do norte apresentou valores de 3,6 a $>1,1 \times 10^5$ NMP.g⁻¹ (Tabela 2) e maior média ($4,4 \times 10^4$ NMP.g⁻¹) para as amostras da feira livre (Tabela 3). A legislação brasileira (RDC nº 12) também não estabelece limites para esse grupo de micro-organismos, embora elevadas contagens possam representar presença de outras bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae*, potencialmente patogênicas.

A estimativa de coliformes a 45°C para o queijo de coalho variou de $1,1 \times 10$ a $2,1 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ (Tabela 1), com média de $1,1 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, para as amostras oriundas dos mini-mercados (Tabela 3). Contagens inferiores para coliformes a 45°C foram obtidas em amostras de requeijão do norte que variaram entre 3,6 a $2,3 \times 10$ UFC.g⁻¹ (Tabela 2) e maior média ($9,5 \times 10^2$ UFC.g⁻¹) nas padarias (Tabela 3). A elevada contagem de coliformes a 45°C no queijo de coalho sugere a utilização de leite cru ou cozimento brando na sua produção. Enquanto a contaminação do requeijão do norte, demonstra contaminação posterior ao processamento térmico, uma vez que ao ser elaborado, é submetido à temperatura elevada, que auxilia na eliminação de bactérias termolábeis como os coliformes.

A legislação determina um limite de 5×10^2 NMP.g⁻¹ para esses queijos, assim o queijo de coalho esteve impróprio em 70% das amostras. *Escherichia coli* foi encontrada em 50% das amostras de queijo de coalho e em 7% das amostras de requeijão do norte. Os coliformes a 45°C pertencem a um grupo de bactérias que têm seu habitat no trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente, e sua presença no alimento indica contaminação do produto com material fecal, evidenciando um risco para a saúde dos consumidores devido algumas estirpes serem altamente patogênicas (SALOTTI et al., 2006).

O queijo de coalho, apresentou contaminação por *Staphylococcus* spp. da ordem de $2,0 \times 10^4$ a $7,2 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ (Tabela 1), destacando-se como as mais contaminadas as amostras provenientes da feira livre (média de $1,8 \times 10^8$ UFC.g⁻¹, Tabela 3). No requeijão do norte a contagem foi de $1,6 \times 10^3$ a $5,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ com maior média nas padarias ($1,8 \times 10^5$ UFC.g⁻¹). *Staphylococcus coagulase* positiva foi isolado em 80 e 7% das amostras de queijo de coalho e requeijão do norte, respectivamente, sendo as amostras de queijo de coalho provenientes das padarias as mais contaminadas ($1,5 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, Tabela 3). Essas amostras

ultrapassaram, para esse grupo, o limite preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), que determina que a contagem máxima seja de até 5×10^2 UFC.g⁻¹. A intoxicação estafilocócica é a causa mais frequente de surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos e casos esporádicos atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em muitos países (CARMO et al., 2002). Em razão de estafilococos serem comumente encontrados nas fossas nasais, garganta, leito subungueal e pele de portadores humanos, estudos epidemiológicos de surtos de intoxicação estafilocócica têm apontado os manipuladores como a principal fonte de contaminação do alimento (PEREIRA et al., 1999).

Quanto à pesquisa de *Salmonella* spp., não foi detectado a presença deste micro-organismo nas amostras analisadas, atendendo ao estipulado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001a), ou seja, ausência em 25g de alimento. A ausência de *Salmonella* spp. nas amostras pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas, que tornam o queijo um meio adverso à sobrevivência de micro-organismos patogênicos ou pela condição estressante advinda do processamento e estocagem a que o alimento é submetido (ALMEIDA et al., 2003).

As amostras da feira livre destacaram-se por apresentar as piores condições de comercialização. Este fato ocorre devido às precárias condições de higiene dos boxes de comercialização, além da falta de sanitização das facas de corte, uso de flanelas para a retirada de resíduos e limpeza das mãos e o uso de plásticos já engordurados para embalar o produto. O ambiente apresentava-se sujo, com presença de gaiolas de pássaros, teias de aranha e demais insetos voadores (Figura 2). Em alguns casos, os queijos ficavam amontoados ou atrás de bancadas sem serem embalados adequadamente.

Mesmo os boxes da feira apresentando todos esses problemas, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as amostras de todos os estabelecimentos (Tabela 3), demonstrando que todos os estabelecimentos comercializam produtos de má qualidade microbiológica. A elevada incidência dos micro-organismos presentes nos produtos pode estar relacionada tanto às falhas de produção quanto à temperatura em que os produtos eram comercializados, além da manipulação excessiva pelos vendedores em virtude da venda a granel dos produtos. A falta de conhecimentos tecnológicos da mão-de-obra, padronização

de produção e fiscalização acentua os fatores que contribuem para a má qualidade microbiológica dos queijos.

Resistência antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de seis estirpes de *E. coli* e nove de *Staphylococcus* coagulase positiva estão apresentados nas Figuras 3 e 4. *Escherichia coli* apresentou grande percentual de sensibilidade a quatro grupos de antimicrobianos (β -actâmicos, nitrofuranos, quinolonas e sulfonamidas) e baixo perfil de resistência intermediária e resistência apenas para o grupo dos β -lactâmicos (Figura 3). As estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram perfil de susceptibilidade a cinco grupos de antibióticos (β -lactâmicos, tetraciclina, fenicóis, quinolonas e sulfonamidas) e perfil de resistência intermediária aos antibióticos ceftazidima (11,1%), vancomicina (22,3%) e nitrofurantoína (44,4%). Apresentaram resistência a nitrofurantoína (55,6%), vancomicina (77,8%) e tetraciclina (88,8%) (Figura 4).

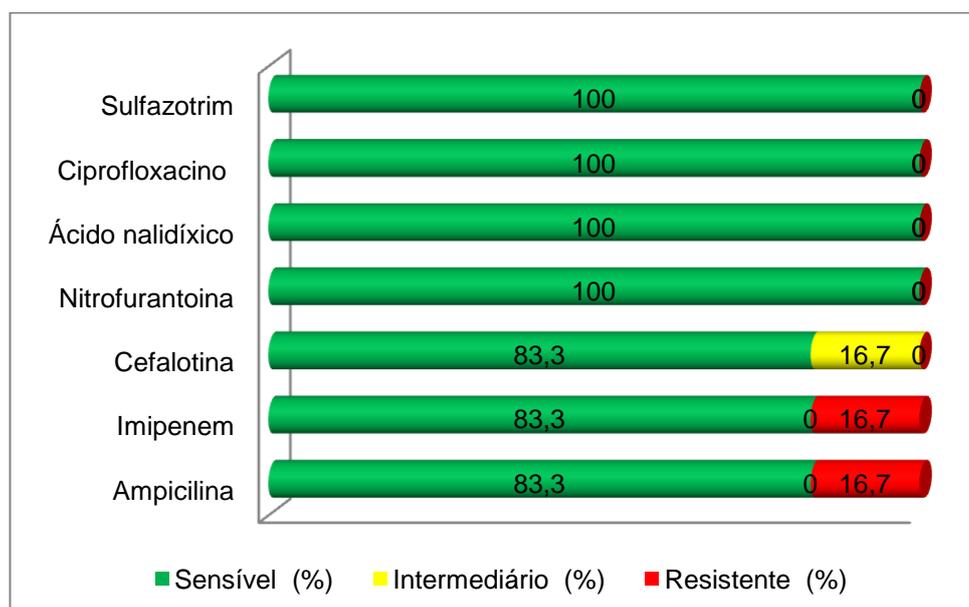


Figura 3. Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de amostras de queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas, Bahia.

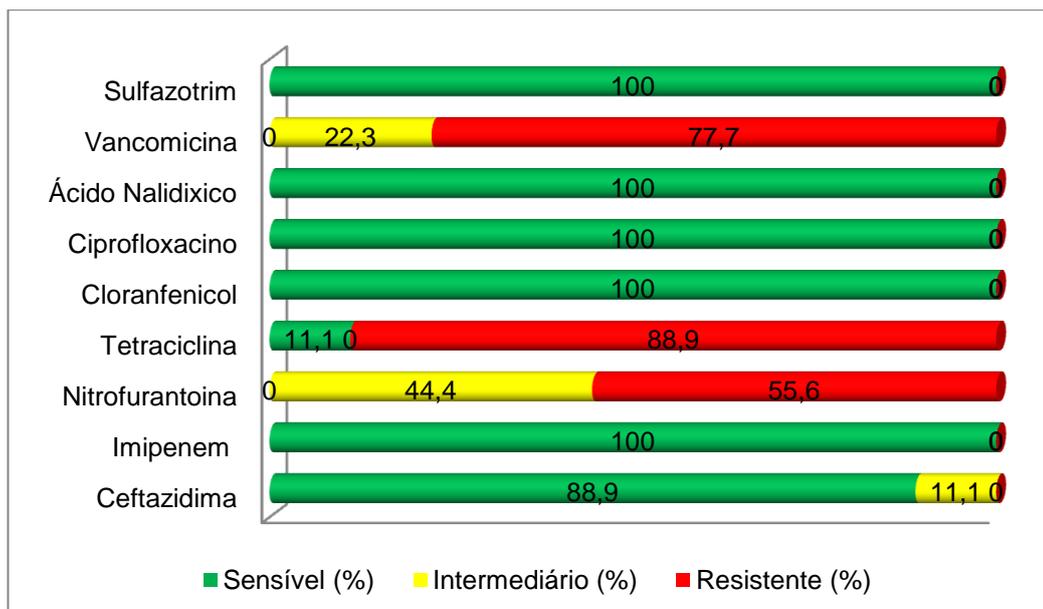


Figura 4. Percentual de susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de amostras de queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas, Bahia.

Considerando que o queijo artesanal é um produto bastante manipulado, deve-se salientar que as bactérias *E. coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*, podem ser oriundas tanto da matéria-prima, quanto dos manipuladores e por isso, não se pode afirmar que as cepas com resistência vieram apenas do rebanho leiteiro tratado com antibióticos.

A elevada susceptibilidade (100%) para ambas as bactérias aos antimicrobianos ácido nalidíxico e ciprofloxacino (grupo das quinolonas) e ao sulfazotrim (sulfonamidas) (Figura 3 e 4) é bastante satisfatória, visto que a resistência às quinolonas tem emergido como um importante problema de saúde pública, resultante da sua livre utilização na produção animal, dentre outros (JACOBY, 2005). A associação das sulfas com o trimetoprim (sulfazotrim) atua bloqueando a formação dos ácidos que são necessários a síntese das bases purinas, metionina e timina, essenciais para o metabolismo da célula bacteriana (TRABULSI et al., 1999).

Para os isolados de *E. coli*, constatou-se que algumas estirpes apresentaram resistência intermediária à cefalotina (16,7%) e resistência à ampicilina (16,7%) e imipenem (16,7%), todos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos. Os bacilos Gram-negativos produzem enzimas do tipo β -lactamases

que são codificadas em genes cromossômicos e plasmidiais, capazes de destruir a ação antimicrobiana dos antibióticos β -lactâmicos (TAVARES, 2009). Esse tipo de resistência é preocupante uma vez que a maioria dos genes para a produção das enzimas β -lactamases reside em regiões móveis do DNA bacteriano, tornando-os transferíveis para outras bactérias (SPINDLER, 2009).

As estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram perfil de resistência à nitrofurantoína (55,6%), à vancomicina (77,7%) e à tetraciclina (88,9%) (Figuras 4). O grau de resistência encontrado frente à nitrofurantoína pode ser justificado, pelo uso inadequado que acarreta alterações cromossômicas (COSTA, et al., 2002) ou devido à transferência de genes entre bactérias por gerações. Segundo a Instrução Normativa número 9, de 27 de junho de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), é proibida a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e a utilização desse princípio ativo e produtos que os contenham para uso veterinário. Os produtos autorizados que continham tais fármacos foram retirados do comércio, devido aos efeitos tóxicos que causariam à espécie humana caso fossem consumidos na forma de resíduos em carne, leite e derivados.

A resistência elevada à tetraciclina (Tabela 4) pelos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva é um resultado presumível, uma vez que este antimicrobiano é um dos mais antigos, sendo usado tanto para o tratamento como promotor de crescimento (FUZIHARA, 2001). A resistência adquirida à este antimicrobiano pode ser devida a alterações cromossômicas resultantes de mutação ou adquirida pela transferência de genes de resistência (TAVARES, 2009). Apesar de ter sido banido no Brasil em 1998, como aditivo alimentar em rações de animais, ainda se faz o uso desse antibiótico (ROSSI, 2005).

Sensibilidade à vancomicina pelas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva, (22,3% de sensibilidade intermediária e 77,7% de resistência) (Tabela 4) pode estar relacionada ao espessamento da parede celular ou ao aprisionamento das drogas pela hiperprodução de componentes da parede (TAVARES, 2009). A redução da sensibilidade à vancomicina está descrita pelo U. S. Department of Health Care Services of the United States of America em 1997 e representa uma grande preocupação por se tratar de uma das últimas opções terapêuticas contra este micro-organismo (HOEFEL; LAUTERT, 2006) sendo proibido seu uso na medicina veterinária.

O perfil de multiresistência para os isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva (índice MAR) mostrou que nenhum dos isolados de *E. coli* apresentaram multiresistência diferentemente do observado para *Staphylococcus* coagulase positiva (Tabela 4). Perfil de multiresistência representa sérios problemas terapêuticos devido ao progressivo declínio do número de antimicrobianos com eficácia para o tratamento das infecções humanas e animais (LEVY, 2002).

Quando realizado o teste de cura do plasmídeo nos dois isolados observou-se que 100% das estirpes de *E. coli* apresentaram fenótipo de resistência mediada por plasmídios (perda do plasmídeo) (Tabela 4). Enquanto nas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva a resistência mediada por plasmídeo foi observada apenas em 44,4%. Resistência envolvendo genes cromossomais, uma vez que essa característica não foi perdida, foi observada em cinco estirpes para a vancomicina e a tetraciclina, e em três estirpes para a nitrofurantoína. Resistência mediada por plasmídeo em duas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva a vancomicina também foi observada (Tabela 4).

Tabela 4. Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) e perfil de resistência plasmidial de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de queijo, em Cruz das Almas – Ba.

Cepa	Resistência aos Antimicrobianos	MAR (%)	Resistência Plasmidial
Ec C8	IMP	14,3	IMP
Ec C9	AMP	14,3	AMP
Sc+ C1	TET	11,1	-
Sc+ C2	NIT – TET – VAN	33,3	NIT – TET
Sc+ C3	NIT – TET – VAN	33,3	NIT – TET
Sc+ C4	TET	11,1	-
Sc+ C5	NIT – TET – VAN	33,3	-
Sc+ C7	NIT – VAN	22,2	-
Sc+ C9	VAN – TET	22,2	VAN
Sc+ C10	NIT – TET – VAN	33,3	VAN
Sc+ R5	TET – VAN	22,2	-

Ec = *E. coli*; Sc+ = *Staphylococcus* coag. +. IMP = imipenem, AMP = ampicilina, TET = Tetraciclina, NIT = nitrofurantoína, VAN = vancomicina.

A resistência cromossômica depende de mutação espontânea, um evento raro, sendo dirigida quase sempre a uma só droga e os genes transferidos com frequência relativamente baixa. Por isso, seu impacto clínico é menor que o da resistência plasmidial (ALTERTHUM, 2008). Por outro lado, a presença de plasmídios-R torna possível a troca de genes de resistência entre as bactérias. Este fenômeno de seleção cruzada contribui para o aumento dramático do número de múltipla resistência bacteriana, aumentando assim o risco de transferência de plasmídios e codificação de resistência para microrganismos patogênicos (MIRANDA; ZEMELMAN, 2002).

Conclusões

O queijo de coalho e requeijão do norte comercializados em Cruz das Almas apresentam elevada carga microbiana, podendo servir de veículos para surtos de toxiinfecções alimentares. Adicionalmente, a identificação de estirpes resistentes de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva multirresistentes demonstra o risco na disseminação de bactérias resistentes a diversas drogas a população usuária desses alimentos.

Referências Bibliográficas

- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 06, p. 1037-1050, 2007.
- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijos tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 79, 2003.
- ANDRADE S. P. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2002. 697p.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. Review. The Fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.16, p.5-15, 2000.
- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008. v. 1, p.67-84.

ALVES, L. M. C. et al. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - Ma. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n.2, p. 01-13, 2009.

AUGUSTO, M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 2003. 217f. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) – Universidade de São Paulo, Campinas.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Resolução – RDC nº 12, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, 10 de jan. de 2001a. Art. 4a, p.1-48.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de jun. de 2003. Dispõe sobre a proibição de fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, 30 jun. 2003. Seção 1, p.1-2.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de jun. de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da União**, 16 de jul. de 2001b.

BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira CEPPA**, v. 21, n. 01, p. 31-40, 2003.

CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 01, p. 9-14, 2002.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne (PA): CLSI; 2010.

DAGOSTIN, J. L. A. **Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo minas frescal elaborado a partir de leite carbonatado**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba,

FERGUSON, J. et al. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and qflex ((R)) kit chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, p. 109-113, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. F. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FUZHARA, T. O. **Freqüência e características de *Salmonella* em abatedouros de pequeno e médio portes da região do grande ABC**. 2001. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUEDES NETO, L. G. **Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp. e de bactérias ácido-lácticas e de sua atividade antagonista *in vitro***. 2004. 94f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GUERIN, F. et al. Outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 2985-2988, 2000.

HIRSCH, D. et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambiente aquáticos. **Ciência Agrotécnica**, v. 30, n. 06, p. 1211-1217, 2006.

HOEFEL, H.; LAUTERT L. Errors committed by nursing technicians and assistants in administrating antibiotics. **American Journal of Infection Control**. v. 34, p. 437-42, 2006.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infection Diseases**, v. 41, p. 120–126, 2005.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington:APHA 2001, p. 387–400.

LEVY, S. B. **The antibiotic Paradox. How the misuse of antibiotics destroy their curative powers**. 2. ed. Cambridge: Perseus Publisbring, 2002. 296p.

MELLO, V. F. **Aplicação do sistema de gestão de segurança de alimentos em uma indústria de bebidas orgânicas**. 2007. 66 p. Dissertação (Mestrado em

Ciências e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **The Science of the Total Environment**. v. 293, p. 207-218, 2002.

MITCHELL, M. A. Therapeutic review: enrofloxacin. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 15, n. 01, p. 66-69, 2006.

MOGENSEN, G. et al. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin International Dairy Federation**. n. 377, p. 4-9, 2003.

NICOLAU, E. S. et al. Qualidade microbiológica dos queijos tipo Minas Frescal, Prato e Mussarela comercializados em Goiás. In: XVIII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. **Anais...** v. 56, n. 321, p. 200-205, 2001.

PEREIRA, M. L. et al. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, v.13, p.48-55, 1999.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 04, p. 913-914, 2008.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 536p.

SPINDLER, A. **Caracterização de cepas de *Pseudomonas* spp isoladas de efluente hospitalar não tratado: resistência a beta-lactâmicos e presença de Integrons**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2009, 599p.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 04, p. 493-499, 2001.

WIKLER, M. A. et al. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth Informational Supplement**. Pensilvânia: Wayne, Pa. - Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 05, n. 01, 2005. 167p.