

UNIRV - UNIVERSIDADE DE RIO VERDE
FACULDADE DE BIOLOGIA E QUIMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA E BACHARELADO

Isolamento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos em queijo do tipo frescal artesanal comercializado no distrito de Ouroana – Go

ACADÊMICO: YESTER RIBEIRO DA SILVA
ORIENTADORA: PROF^a. Me. DÉBORA CABRAL MACHADO

Artigo apresentado à Faculdade de Biologia e Química da UNIRV – Universidade de Rio Verde, como parte das exigências para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

RIO VERDE - GOIÁS

2016

Isolamento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos em queijo do tipo frescal artesanal comercializado no distrito de Ouroana – Go

Yester Ribeiro da Silva ¹

Débora Cabral Machado ²

RESUMO

O leite e seus derivados são alimentos muito presentes na dieta do brasileiro, tanto por seu valor nutricional, quanto por seu valor funcional, neste último caso, especialmente os derivados fermentados. O queijo do tipo frescal artesanal é tradicionalmente produzido e comercializado em condições higiênico-sanitárias que nem sempre garantem boa qualidade microbiológica ao produto. Levando-se em consideração o exposto, com este trabalho de pesquisa tivemos como objetivos isolar as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de amostras de queijo frescal artesanal adquirido no comércio informal de Ouroana – Go e testar a resistência ou sensibilidade destas bactérias aos antibióticos: ampicilina (10µg), cefalexina (30 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), penicilina (10 U) e tetraciclina (30 µg). A metodologia usada para o isolamento das bactérias foi a proposta por Silveira et al., (1997) e a metodologia usada para a determinação de resistência ou sensibilidade aos antibióticos foi a de Koneman (2001). Confirmamos com as análises microbiológicas a presença de *E. coli* e de *Staphylococcus* coagulase negativo. O antibiograma demonstrou que a *E. coli* foi sensível aos antibióticos ampicilina (10µg), cefalexina (30 µg), gentamicina (10 µg) e neomicina (30 µg) e resistente aos antibióticos penicilina (10 U) e tetraciclina (30 µg); e o *Staphylococcus* coagulase negativo foi sensível aos mesmos antibióticos. Diante destes resultados conclui-se que o queijo frescal analisado não foi produzido adotando-se medidas higiênico-sanitárias adequadas e que é um alimento que pode contribuir para a disseminação de bactéria resistentes aos antibióticos.

Palavras-chave: Queijo Frescal, Qualidade Microbiológica, Resistência Antimicrobiana

¹Acadêmico do curso de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. UniRV.

²Professora Mestre da Faculdade de Biologia da Universidade de Rio Verde – UniRV

1. INTRODUÇÃO

O leite de vaca e seus derivados são alimentos que compõem a dieta do brasileiro, devido aos seus benefícios nutricionais e funcionais; esta realidade pôde ser constatada em um trabalho de pesquisa realizado em Santa Maria – RS, no qual os pesquisadores avaliaram, dentre outros fatores, os motivos relacionados à compra destes alimentos. Dos 253 indivíduos adultos entrevistados, 98,4% relataram que o queijo é o segundo alimento lácteo mais consumido. Este mesmo estudo apontou que as propriedades funcionais dos lácteos são um dos motivos que leva os consumidores entrevistados a adquirirem estes produtos (SOUZA et al., 2013).

O consumo de alimentos fermentados se dá pelos prováveis benefícios a saúde promovidos por estes organismos tais como melhora da intolerância a lactose, a diminuição do colesterol e as atividades contra o câncer (JAY, 2005).

De acordo com Jay (2005) probióticos são produtos que contem microrganismos vivos, os quais são, ou acredita-se que sejam, benéficos ao consumidor. Segundo Forsythe (2005) um probiótico pode ser definido como um “suplemento alimentar microbiano vivo o qual afeta o animal hospedeiro, por meio da melhoria do seu balanço microbiano intestinal”. Ainda segundo Massaguer (2005) os probióticos incluem bactérias lácteas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado, que exibem o efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro e entre esses incluem os lactobacilos.

O consumo de alimentos fermentados contendo probióticos, tem sido relacionado à manutenção da microbiota intestinal e prevenção de doenças, principalmente as intestinais (BURITI & SAAD, 2007). A microbiota intestinal saudável forma uma barreira contra os microrganismos patógenos, potencializando os mecanismos de defesa do organismo, melhorando a imunidade intestinal pela aderência à mucosa e estimulando as respostas imunes locais. Além disso, ela também compete por combustíveis intraluminais, prevenindo o crescimento das bactérias patogênicas (MATHAI, 2002).

A nutrição tem papel importante na perspectiva de melhora do estado nutricional e clínico de pacientes com doença de Crohn, atuando na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas, além de fornecer o suporte energético para manutenção da vida. Flora & Dichi (2006) realizaram estudo que avaliou a possibilidade de intervenção nutricional para diminuir a atividade inflamatória da doença de Crohn com

o uso de nutrientes imunomoduladores entre os quais destacam-se nutrientes específicos como arginina, glutamina, ácidos graxos, nucleotídeos, além de probióticos e prebióticos. Segundo Denipote et al., (2010), a administração conjunta de probióticos e prebióticos (simbióticos) possui efeito superior do que quando administrados separadamente. Várias funções benéficas ao organismo tem sido atribuídas ao consumo regular de produtos contendo bactérias probióticas (ROCHET, 2006).

Conforme Collins et al., (1989), o grupo dos lactobacilos típicos do hospedeiro humano inclui as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus zeae*.

Os produtos fermentados (iogurtes, queijos e leites fermentados) constituem os principais veículos alimentícios de sobrevivência, utilizados na aplicação dos probióticos (JACINTHO, 2008).

Segundo Franco e Landgraf (2008), o leite é um alimento muito propício ao crescimento microbiano e os microrganismos contaminantes do leite e seus derivados em geral são provenientes da ordenha, dos equipamentos, da manipulação, do transporte, do processamento e do armazenamento destes produtos.

Dentre os microrganismos que podem ser encontrados no leite cru estão as bactérias do grupo dos coliformes, sendo que a espécie *Escherichia coli* tem sido utilizada com indicador de contaminação fecal. Já a presença da bactéria *Staphylococcus aureus* está associada à ocorrência de mastite estafilocócica em rebanhos leiteiros e ao fato deste microrganismo ser encontrado na pele e oro – faringe humana; sendo assim, a ordenha e a manipulação seriam as vias principais de transmissão do *S. aureus* para o leite e seus derivados (JAY, 2005).

As espécies do gênero *Escherichia* são membros universais do trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente; são bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose à 44,5 – 45,5°C. A *E. coli* geralmente não é patógeno intestinal, mas a sua presença no trato urinário é frequentemente associada à infecção urinária; além disso, algumas cepas desta espécie podem provocar intoxicações ou infecções graves, como a *E. coli* enterotoxigênica, e a *E. coli* enteroemorrágica (TORTORA et al., 2000).

Dentre as espécies de *Staphylococcus*, o *S. aureus*, o *S. epidermidis* e o *S. saprofiticus*, são as de maior importância clínica. As bactérias deste gênero são cocos Gram positivos arranjados em cachos, podendo ser também encontrados isolados, aos pares, em tétrades e em cadeias são, aeróbias ou macroaerófilas, mesófilas, sendo que o

S. aureus é coagulase positivo e o *S. epidermidis* e o *S. saprofiticus* apresentam resultado negativos para esta prova bioquímica. O *S aureus* está relacionado à surtos de intoxicação alimentar, quando esta bactéria cresce em alimentos ricos em carboidratos e proteínas (BROOKS et al., 1995).

A contaminação por *S. aureus* pode ocorrer após o processamento ou cozimento, durante o preparo do alimento nos domicílios ou nos estabelecimentos alimentícios devido à manipulação e/ou a inadequada refrigeração antes do consumo. Em comidas processadas a contaminação pode ser resultante de fontes humanas, animais ou ambientais. O potencial para desenvolvimento da enterotoxina é superior em alimentos expostos a temperaturas que permitem o crescimento do *Staphylococcus aureus*. Em alimentos processados nos quais o *S. aureus* é destruído durante o processamento a presença deste indica contaminação pela pele, boca, fossas nasais ou mãos dos manipuladores. Quando números elevados de *S. aureus* são encontrados nos alimentos, pode-se suspeitar que a sanitização e o controle da temperatura utilizados foram inadequadas (LANCETTE; BENNETT, 2001).

O queijo frescal artesanal tradicionalmente é produzido com leite não pasteurizado e este é um dos fatores que explicam a presença de microrganismos nestes produtos (PINTO et al., 2011).

Agentes antimicrobianos são substâncias químicas naturais ou sintetizados que matam ou inibem o crescimento microbiano; os antibióticos são drogas antimicrobianas naturais produzidas por microrganismos competidores. A utilização indiscriminada dos antibióticos tem propiciado o aparecimento de bactérias multi - resistentes a estas substâncias (MADIGAN et al., 2004).

Diante do exposto, este trabalho de pesquisa teve o objetivo de isolar as bactérias *E. coli* e *S. aureus* a partir de amostra de queijo do tipo frescal artesanal e avaliar a resistência ou sensibilidade destas bactérias frente a antibióticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da amostra

O queijo frescal artesanal foi adquirido no comércio informal de Ouroana - Go

2.2 Armazenamento e transporte da amostra

A amostra refrigerada e embalada em saco plástico transparente foi adicionada em caixa isotérmica com gelo e transportada, imediatamente, até o laboratório de microbiologia da Universidade de Rio Verde.

2.3 Processamento da amostra

A embalagem foi higienizada, externamente, com água e detergente e posteriormente com álcool etílico 70%. Em cabine de assepsia, próximo à chama do bico de Bunsen, a embalagem foi aberta e, com auxílio de faca e garfo estéreis, todo o queijo foi triturado em pedaços pequenos.

Vinte e cinco gramas do queijo, foram coletadas três vezes, de várias partes do produto, e cada uma delas foi homogeneizada com diluente solução de citrato de sódio 2%, obtendo – se assim a diluição 10^{-1} . Um mililitro da solução 10^{-1} foi transferida para um tubo com 9ml de diluente, para obtenção da diluição 10^{-2} e desta diluição foi repetido o mesmo procedimento para a obtenção da diluição 10^{-3} .

2.4 Análises microbiológicas

2.4.1 Procedimento para o isolamento da *Escherichia coli* técnica do número mais provável

Um mililitro de cada diluição foi transferida para tudo com caldo lactosado, em triplicata (série de três tubos). Após a inoculação os tubos foram incubados a 35°C/24 a 48 h em estufa de incubação (teste presuntivo para coliformes). As análises microbiológicas seguiram a metodologia proposta por Silva et al., (1997).

De cada tubo que apresentou gás no interior do tubinho de Durham, coletou-se uma alçada e inoculou-se no caldo EC que foi incubado a 44,5°C – 45,5°C / 24 h em banho Maria (teste confirmativo para coliformes fecais ou termotolerantes).

De cada tubo que apresentou gás, foi coletada uma alçada e estriada na superfície do ágar eosina azul de metileno (EMB), com incubação a 35°C / 24h. Colônia

sugestivas de *E. coli* verdes, com brilho metálico, com ou sem o centro negro, foram testadas pelas provas bioquímicas do indol, de Voges – Proskauer do vermelho de metila e do Citrato. Bactérias indol positivo, VP negativo, VM positivo e citrato negativo, com formato de bacilos e Gram -, foram confirmadas como *E. coli*.

2.4.2 Procedimento para o isolamento do *Staphylococcus aureus*

Da diluição 10^{-1} foi retirado 1/ ml, que foi fracionado em quatro partes, três de 0,3 ml e uma de 0,1ml. Cada parte foi distribuída na superfície do ágar Baird Parker utilizando-se alça de Drigalski.

Das diluições 10^{-2} e 10^{-3} foram retirados 0,1ml que também foram inoculados no mesmo meio de cultura. Todas as placas foram incubadas à 35°C / 48h.

Colônias sugestivas de *S. aureus*, circulares, pretas, pequenas (1,5mm no máximo) lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona e / ou opaca, halo transparente, foram inoculadas em tubos com caldo BHI (caldo Infusão cérebro coração); os quais foram incubados a 35°C / 24h.

Após a incubação uma alçada de cada tudo foi estriada na superfície da rampa do ágar TSA (Ágar triplicasse de soja), com nova incubação à 35°C / 24 h. estas culturas foram usadas para a prova da catalase e para a coloração diferencial de Gram.

Das culturas em caldo BHI foram retiradas 0,2ml, aos quais foram acrescentados 0,5ml de coagulase plasma – EDTA, para a prova da coagulase.

O restante da cultura em caldo BHI foi submetido à fervura de 15 minutos e após o resfriamento, pequenas porções foram colocadas em orifícios no ágar azul de toluidina DNA, com incubação à 37°C / 4h.

Bactérias com reação positiva, nível 3 e 4, de coagulase, foram confirmadas com *S. aureus*. Reações de nível 1 e 2 foram consideradas coagulase positivas quando acompanhadas de resultado positivo para catalase e termonuclease (formação de halo róseo ao redor do orifício).

2.5 Antibiograma

A metodologia utilizada foi a da prova de sensibilidade por difusão com disco, descrita por Koneman et al., (2001).

2.5.1 Padronização da cultura

Para a obtenção de culturas com 10^8 UFC / ml, colônias de *E. coli* e de *S. aureus* foram inoculadas, separadamente, em caldo nutriente com incubação à 35°C / 4 a 6 horas.

A partir de 4 horas de incubação a turvação das culturas foi comparada com o padrão 0,5 de Macfarland de Ba SO₄.

2.5.2 Prova de sensibilidade para difusão com disco

Um mililitro das culturas foi distribuído na superfície da ágar Muller Hinton e os discos de papel de filtro, impregnados com os antibióticos: ampicilina (10 MCG), cefalexina (30 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), penicilina (10 U) e tetraciclina (30 µg), foram depositados em posições equidistantes. As placas foram incubadas à 35°C / 24h e após este período foram observados e avaliados os halos de inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a análise microbiológica das amostras confirmou-se a presença de *E. coli* e de *Staphylococcus spp.* coagulase negativo. Garcia et al., (2016) também encontraram *Staphylococcus spp* e coliformes em amostras de queijos frescos artesanais e concluíram que estas amostras estavam impróprias para consumo humano. A presença de *Staphylococcus spp* e *E. coli* em amostras de queijo-de-minas frescal foi relacionada à condições inadequados do processamento e à má qualidade microbiológica da matéria prima ROCHA et al., (2006). Rodrigues e Ferreira (2016) detectaram a presença de coliformes termotolerantes em amostras de queijo minas padrão e associaram esta contaminação com a má higiene durante o processamento.

O antibiograma da *E. coli* isolada neste trabalho, revelou a sensibilidade aos antibióticos ampicilina (10 MCG), cefalexina (30 µg), gentamicina (10 µg) e neomicina (30 µg) e resistência aos antibióticos penicilina (10 U) e tetraciclina (30 µg).

O antibiograma do *Staphylococcus spp.* coagulase negativo isolado neste trabalho, revelou sensibilidade a todos os antibióticos que também foram testados contra a *E. coli*.

Campos et al., (2006) isolaram *E. coli* de queijo “minas frescal” e realizaram o antibiograma; os autores detectaram resistência em somente 4% das amostras aos antibióticos ampicilina e tetraciclina.

A *E. coli* e o *S. aureus* isolados de amostras de queijos artesanais (coalho e manteiga) adquiridos no comércio varejista de Cruz das Almas – BA, apresentaram resistência ao antibiótico tetraciclina. Este resultado, segundo os autores, demonstrou que estes alimentos podem ser veículos de toxinfecções alimentares e disseminadores de bactérias resistentes Evangelista-Barreto et al., (2016)

Anselmo et al., (2015) avaliaram vários tipos de preparações alimentícias servidas na merenda escolar de escolas de São José do Rio Preto – SP, quanto à presença de *S. aureus* e *E. coli* resistentes a antimicrobianos. Os autores encontraram nas amostras, *E. coli* e *S. aureus* resistentes a ampicilina e penicilina, respectivamente e concluíram que estes resultados demonstraram a necessidade de aperfeiçoar as condições de preparo dos alimentos, devido ao risco de transmissão de doenças e à limitação do uso de antibióticos nos tratamentos das infecções bacterianas.

A preocupação com toxinfecções alimentares provocadas por *E. coli* e *S. aureus* motivou a realização de um trabalho de pesquisa para testar a atividade antibacteriana de óleo essencial extraído do orégano (*Origanum vulgare*); os pesquisadores concluíram que o óleo essencial testado foi inibidor para diferentes amostras das duas bactérias (Araújo e Longo 2016).

Zago et al., (2009) testaram o efeito inibidor combinado de óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre *E. coli* e *S. aureus* isolados a partir de amostras clínicas humanas e concluíram que o *S. aureus* foi mais sensível às combinações testadas e que os antibióticos gentamicina, tetraciclina e ciprofloxacina combinados com óleos essenciais foram os mais eficientes na inibição desta bactéria.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- _ O queijo do tipo frescal artesanal analisado não foi produzido adotando-se medidas higiênicas sanitárias adequadas, em decorrência da presença de *E. coli*.
- _ A presença de *Staphylococcus* coagulase negativo, embora não seja preocupante do ponto de vista de intoxicação alimentar, levanta suspeitas sobre a qualidade da manipulação deste produto, uma vez que as bactérias deste gênero colonizam pele humana.
- _ O queijo analisado pode contribuir para a disseminação de bactérias resistente a antibióticos.

5. REFERÊNCIAS

ANSELMO, D.B, WERLE, C.H, HOFFMANN, F.L. **Ocorrência de Escherichia coli e Staphylococcus aureus resistentes a antimicrobianos e parasitos Entamoeba coli e Ascaris lumbricoides em merendas escolares.** Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2015;74(4):3999-409.

ARAUJO, M.M, LONGO, P.L. **Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de Origanum vulgare (orégano) diante das cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus.** Arquivos do Instituto Biológico, [S.l.], v. 83, p. 01-07, oct. 2016. ISSN 1808-1657.

BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORNSTON, L.N. **Microbiologia médica: de Jawetz, Melnick & Adelberg.** GUANABARA KOOGAN 20^a ed. 1995.

BURITI, F.C.A & SAAD, S.M.I. **Bactérias do grupo Lactobacillus casei: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana.** Archivos latinoamericanos de nutricion Vol.57, Nº 4, 2007, p.373-383.

CAMPOS, M.R.H. et al. **Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de Escherichia coli isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo "Minas Frescal" em um laticínio de Goiás, Brasil.** Ciência Rural, <http://revistas.bvs-vet.org.br/crural>, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, apr. 2006. ISSN 1678-4596.

COLLINS, M.D, PHILLIPS.B.A, ZANONI.P. **Deoxyribonucleic acid homology studies of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei sp. nov., subsp. paracasei and**

subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1989; 39 (2): 105-108.

DENIPOTE, F.G. et al., **Probióticos e prebióticos na atenção primária ao cancer de colon**. Vol.47, Nº 1 – Jan/Mar. 2010.

EVANGELISTA – BARRETO et al., **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.10, n1) p.55-67, jan-março (2016).

FLORA A.P.L, DICHLI. **Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal**. Revista Brasileira de Nutrição Clínica, Campinas, SP, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. ARTMED: Porto Alegre. 2005.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF. M. **Microbiologia dos alimentos**. ATHENEU: São Paulo. 2008.

JACINTHO, T. M. **Como sobrevivem os microrganismos dentro do alimento lácteo em prateleira**. 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed.- Porto Alegre: ARTMED, 2005.

LANCETTE, G.A., BENNETT, R.W., 2001. **Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins**. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Apha, Washington, pp. 387–403.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004

MASSAGUER P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**, VARELA: São Paulo. 2005.

MATHAI, K. **Nutrição na idade adulta**. In: MAHAN, L.K. editor. ESCOTT-STUMP, S. Krause – Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002.

PINTO, F. G. S. et al., **Qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR**, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, n. 2, p.191-198, 2011.

RADDI, M.S.G. et al., **Staphylococcus aureus: portadores entre manipuladores de alimentos**. Rev. Saúde públ., S.Paulo, 22:36-40, 1988.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C.; SAAD, S. M. **Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal**. Arq. bras. med. vet. zootec, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

ROCHET, V. et al., **Effects of orally administered Lactobacillus casei DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans**. Br. J. Nutr. V.95, p.421-429, 2006.

RODRIGUES, C. R. F., & FERREIRA, L. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária-MG**. Caderno de Ciências Agrárias, 8(1), 57-61, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SOUZA, A. P. B., FUKU, G., & NORBERG, J. L. **Fatores que influenciam a compra e conhecimento sobre propriedades funcionais de produtos lácteos**. *Disciplinarum Scientia| Saúde*, 14(2), 273-284, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

ZAGO, J. A. et al. **Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de Staphylococcus aureus e Escherichia coli isoladas de casos clínicos humanos**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Sociedade Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.