

SALMONELAS ISOLADAS DE QUEIJOS TIPO "COALHO": CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS — RECIFE (PE)

Maria José de SENA *
Mônica M.O.P. CERQUEIRA **
Deise A. dos SANTOS ***
Geraldo LEOCADIO FILHO ****
Ricardo Souza DIAS*****

RIALA 6/845

SENA, M. J. e col. — Salmonelas Isoladas de Queijos Tipo "Coalho": Caracterização Sorológica e Resistência a Agentes Antimicrobianos — Recife (Pe). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 58 (1): 13-17, 1999.

RESUMO: Com o objetivo de isolar, identificar e avaliar a resistência antimicrobiana de linhagens de *Salmonella*, 107 amostras de queijo tipo "coalho" foram colhidas no período de janeiro a maio de 1997, no comércio varejista de Recife (PE). As amostras, obtidas de estabelecimentos comerciais que acondicionavam o produto em temperatura ambiente, variando entre 29,0 e 33,0°C eram transportadas em embalagens plásticas hermeticamente fechadas, sob refrigeração por via aérea até Belo Horizonte (MG) onde eram prontamente analisadas pelo Serviço de Microbiologia de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O isolamento e identificação de *Salmonella* foram realizados segundo metodologia preconizada por VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). Das amostras analisadas, 8,41% (9/107) apresentaram-se positivas para *Salmonella*. *Salmonella* I (O11:-:1,6; O18; 6,7:k:-; 3,10:y:-; 6,7:-:enz₁₅; 13,23:z:-); *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* foi identificada individualmente em 11,11% (1/9) das amostras. Apenas *Salmonella enterica* subsp I (6,7:-:enz₁₅) apresentou frequência de 22,22% de positividade (2/9). As linhagens isoladas apresentaram resistência frente a 37,5% (6/16) dos produtos antimicrobianos testados: ampicilina, tetraciclina, cefotaxima, sulfametopina, trimetoprim e sulfazotrim. A sensibilidade foi observada em 62,5% (10/16), frente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina, tobramicina, ceftazidima, amoxicilina, polimixina B, gentamicina, cloranfenicol, amicacina, ofloxacina e cefoxitina.

DESCRITORES: Queijo Coalho, *Salmonella*, Antimicrobianos

INTRODUÇÃO

De acordo com o Código de Defesa do Consumidor, é de responsabilidade do Serviço de Vigilância Epidemiológica, garantir, através de ações e atividades, a saúde e segurança da comunidade contra os riscos provocados por práticas no fornecimento de produtos e serviços considerados perigosos e nocivos.

Entre os derivados lácteos, vários relatos^{3,4,5} têm comprovado o envolvimento de queijos nas enfermida-

des transmitidas por alimentos demonstrando a alta frequência de contaminação destes produtos por microrganismos patogênicos. Comumente, tem sido observada a contaminação por coliformes fecais, *Staphylococcus* sp, *Listeria* sp, *Proteus* sp e *Salmonella* sp.

A ocorrência de infecções causadas por *Salmonella* adaptadas a espécie humana está diretamente relacionada com a produção de alimentos de origem animal destinados ao consumo humano². Em relação a contaminação de queijos por *Salmonella*, Papadopoulos et. al., (1993)⁶

* Departamento de Medicina Veterinária — Universidade Federal Rural de Pernambuco

** Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal — Universidade Federal de Minas Gerais

*** Estudante de Biologia — Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

**** Divisão de Biologia Médica — Fundação Ezequiel Dias

***** Serviço de Microbiologia de Alimentos — Divisão de Bromatologia e Toxicologia — Fundação Ezequiel Dias — Rua Conde Pereira Carneiro, 80 — Gameleira — 30510-010 — Belo Horizonte / Minas Gerais.

descreveram que a presença deste patógeno, um dos mais importantes agentes de toxinfecção alimentar associados a produtos lácteos, tem sido adequadamente investigado devido ao seu significado em saúde pública¹¹.

Salmonella é usualmente encontrada no trato intestinal de animais domésticos e selvagens, especialmente aves e répteis. Os principais veículos de disseminação de *Salmonella* têm sido os alimentos e a água.

A criação intensiva de gado leiteiro e ou de corte tem como consequência o uso indiscriminado de substâncias antibióticas visando prevenir doenças causadas por bactérias e protozoários, melhorar a conversão alimentar e reduzir o custo com a alimentação¹.

O uso indiscriminado de substâncias antibióticas associadas a não observância do período de carência das drogas utilizadas levam a uma seleção de cepas^{7,15}. Esta resistência pode comprometer o efeito da antibioticoterapia utilizada em infecções humanas ou em animais causadas por estes microrganismos. Embora os dados na literatura brasileira^{4,9,10} demonstrem a presença desse microrganismo em queijos fabricados artesanalmente, as citações referentes a sua frequência em queijos tipo "coalho" comercializados na região Nordeste do país, são escassas¹⁰. Adicionalmente o perfil de resistência dessas bactérias a drogas antimicrobianas de uso comum em medicina humana e veterinária, não tem sido investigado.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Obtenção das amostras

As cepas de *Salmonella* testadas quanto a antibiótico-resistência foram isoladas de amostras de queijos tipo "coalho" colhidas no período de janeiro a maio de 1997, no comércio varejista de Recife (PE), em sete locais diferentes. As amostras foram obtidas de estabelecimentos comerciais que acondicionavam o produto em temperatura ambiente, variando entre 29,0 e 33,0°C e transportadas sob refrigeração em embalagens plásticas hermeticamente fechadas, por via aérea até Belo Horizonte (MG), onde foram prontamente analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

2.2- Isolamento e identificação de *Salmonella* sp.

A metodologia de análise empregada para o isolamento do microrganismo foi segundo Vanderzant & Splittstoesser (1992)¹⁶. Na etapa de pré-enriquecimento, 25g do alimento foram pesadas e homogeneizadas em 225 mL de Água Peptonada Tamponada 1%. Posteriormente o material foi incubado por 18-24 horas a 37°C, sob condições de aerobiose. Uma alíquota de 0,1mL foi transferida para o caldo Selenito-Cistina e incubada a 37°C por 24h, para etapa de enriquecimento seletivo. Foi utilizada, ainda,

uma metodologia alternativa, onde 0,1mL do caldo pré-enriquecido foi inoculado em caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 43°C por 24h, sob condições de aerobiose¹². O isolamento diferencial foi efetuado semeando-se os caldos em ágar *Salmonella-Shigella* e ágar entérico Hektoen a 37°C por um período de 24h. As colônias suspeitas foram em seguida, inoculadas simultaneamente em ágar Tríplice açúcar ferro e ágar açúcar ferro a 37°C por 24h. As culturas positivas foram submetidas às provas de aglutinação com soro polivalente "O" na Divisão de Biologia Médica-IOM-FUNED, e posteriormente enviadas para o Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, para identificação sorológica.

2.3- Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Simultaneamente as cepas de *Salmonella* foram testadas quanto a resistência a diferentes antibióticos de uso comum em medicina humana e veterinária. Os antibióticos usados no teste foram: Tetraciclina (10µg), Clo-ranfenicol (30µg), Trimetropim (5µg), Sulfazotrin (25µg), Ampicilina (10µg), Cefotaxima (30µg), Sulfametropina (25µg), Ciprofloxacina (50µg), Tobramicina (10µg), Ceftazidima (30µg), Amoxicilina (10µg), PolimixinaB (300UI), Gentamicina (10µg), Amicacina (30µg), Ofloxacina (5µg), Cefoxitina (30µg). A metodologia empregada foi a descrita pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal, através da Portaria nº 04/94, sob a forma de Manual de Procedimentos para Padronização do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos. A partir da cultura pura, 5 a 10 colônias foram selecionadas e inoculadas em caldo Müller-Hinton, e incubadas a 35°C até obter a turvação padrão 0,5 da escala de Mc Farland. Obtida a turvação, o inóculo foi semeado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton. Com o auxílio de "swabs", a cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton em três diferentes eixos afim de se obter um esfregaço uniforme. Em seguida, os discos de antibióticos foram plicados à superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35°C por um tempo variável de 16 a 20 horas e após esse período, procedeu-se a leitura dos halos de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro mecanismo de proteção contra os distúrbios gastrintestinais causados por bactérias entéricas é exercido pela microbiota intestinal através da produção de uma série de substâncias antagonicas como ácidos graxos, enzimas, bacteriocinas, e substâncias antibióticas. Este fenômeno de proteção ecológica é conhecido como efeito barreira microbiológica (EMB). Segundo

Trabulsi (1991)¹⁴, o uso de antibióticos contra infecções intestinais leva ao desequilíbrio deste efeito com conseqüente surgimento de infecções secundárias.

A resistência adquirida pelos microrganismos é um fenômeno espontâneo, sendo os antimicrobianos apenas agentes seletores de amostras resistentes a estas drogas¹⁴. Segundo Tavares (1988)¹³, nas enterobactérias a resistência é transmitida principalmente por plasmídeos. As enterobactérias uma vez selecionados e ingeridas pelo homem através do alimento poderão não responder satisfatoriamente á antibioticoterapia.

No que se refere a *Salmonella*, a antibioticoterapia torna o paciente mais sensível aos microrganismos, levando a piora do quadro clínico e excreção deste patógeno por períodos mais longos.

Os resultados obtidos revelaram a presença de *Salmonella* sp em 8,41% das amostras analisadas (9/107). *Salmonella* I (O11:-:1,6; O18; 6,7:k:-; 3,10:y:-; 6,7:-:enz₁₅; 13,23:z:-); *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* foi identificada individualmente em 11,11% (1/9). Apenas a *Salmonella enterica* subsp I (6,7:-:enz₁₅) apresentou frequência de 22,22% de positividade (2/9).

Das drogas antimicrobianas testadas, as cepas isoladas apresentaram resistência frente a 37,5% (6/16) dos antimicrobianos: Ampicilina, Tetraciclina, Cefotaxima, Sulfametropina, Trimetoprin, Sulfazotrim. A sensibilidade foi observada em 62,5% (10/16), frente aos seguintes antimicrobianos: Ciprofloxacina, Tobramicina, Ceftazidima, Amoxicilina, Polimixina B, Gentamicina, Cloranfenicol, Amicacina, Ofloxacina, Cefoxitina (Tabela 01).

TABELA 01

Modelo de resistência antimicrobiana de linhagens de *Salmonella* em queijos tipo "coalho" comercializados em Recife (PE)

Modelo de Resistência

	CFO	TET	CLO	TRI	SUT	AMP	CTX	SFT	CIP	TOB	CAZ	AMO	POL	GEN	AMI	OFX
<i>S. enterica</i> subsp.I:																
(11:-:1,6) (1)	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S
(O18) (1)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
(6,7:k:-) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
(3,10:y) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> sp (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
(6,7:-:enz ₁₅) (2)	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
(13,23:z:-) (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Enteritidis</i> (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Total	01	02	0	0	01	01	0	01	0	0	0	0	0	0	01	0

Cefoxitina (CFO-30µg), Tetraciclina (TET-10µg), Cloranfenicol (CLO-30µg), Trimetoprim (TRI-5µg), Sulfazotrim (SUT-25µg), Ampicilina (AMP-10µg), Cefotaxima (CTX-30µg), Sulfametropina (SFT-25µg), Ciprofloxacina (CIP-50µg), Tobramicina (TOB-10µg), Ceftazidima (CAZ-30µg), Amoxicilina (AMO-10µg), Polimixina B (POL-300UI), Gentamicina (GEN-10µg), Amicacina (AMI-30µg), Ofloxacina (OFX-5µg).

Segundo Diaz de Aguayo et al. (1992)⁶, a alta incidência de resistência a drogas pode ser atribuída a ampla utilização de antibióticos no tratamento da população humana e animal.

Os dados observados neste estudo são superiores aos detectados por Diaz de Aguayo et al (1992)⁶ em produtos lácteos comercializados no México. Estes autores verificaram resistência múltipla de *Salmonella* contra diferentes antibióticos, sendo que 4% das amostras de leite pasteurizado apresentavam 100% de resistência a penicilina e alguma resistência a polimixina B e cloranfenicol. Embora estes autores não tenham pesquisado esta resistência em amostras de queijo, tais dados demonstram o risco potencial de veiculação destes microrganismos altamente resistentes a antimicrobianos. Este nível relativamente alto de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos representa um risco real de saúde pública. Esta resistência a drogas torna o controle de agentes infecciosos como a *Salmonella* mais difícil com drogas normalmente usadas no tratamento da doença.

Adicionalmente, deve-se ressaltar o risco potencial de ocorrência deste tipo de toxinfecção alimentar pelo consumo deste tipo de queijo tão produzido e consumi-

do na região Nordeste. Embora a possível causa da contaminação não tenha sido estabelecida, suspeita-se que o problema esteja relacionado a uma somatória de fatores que incluem: uso de leite cru proveniente ou não de vacas com mamite, ordenha em condições higiênico-sanitárias deficientes, manipulação e fabricação do queijo de forma precária e acondicionamento e comercialização em temperatura ambiente.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode se concluir que queijo tipo “coalho” produzido artesanalmente em Pernambuco e comercializado em Recife apresenta alto nível de contaminação por *Salmonella* e resistência a diferentes antimicrobianos, representando risco potencial a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Fundação Ezequiel Dias — Minas Gerais
Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro.

RIALA 6/845

SENA, M. J. et al. — *Salmonella* Isolated from “curd” of Cheese: serological characterization and resistance to antimicrobial agents — Recife (Pe). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 13-17, 1999.

ABSTRACT: One hundred and seven samples of white cheese collected from January to May 1997 in retail trade of Recife (PE) were examined for the presence of *Salmonella*. The isolated *Salmonella* were then checked for antibiotic sensibility. The samples collected, were stored for sale at room temperature varying from 29.0 to 33.0°C and sent to Belo Horizonte city (MG) in plastic container by air mail under refrigeration immediately submitted to microbiological analyses. The methodology used to identify *Salmonella* was according to VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992). *Salmonella* was detected in 8,41% (9/107) of the samples as following: *Salmonella* 1 (O11:-:1,6 ; O18 ; 6,7:k:- ; 3,10:y:- ; 6,7:-enz-15 ;13,23:z:-), *Salmonella* sp. *Salmonella enteritidis* was detected in 11.11% (1/9) of the samples and *Salmonella enterica* subspl (grupo13.23:z:-) in 22.22% (2/9). Resistance against Ampicilin, Tetracyclin Cephotaxin, Sulphametropin, Trimetoprine, Sulfazotrin was verified in 37.5% (6/16) of the strains tested. Sensitivity to Cyprofoxacine, Tobramicin, Ceftazidine, Amoxicilin, Polimixin B, Gentamicin, Clorafenicol, Amicacin, Ofloxacin, Cefoxitin was observed in 62.5% (10/16) of the strains tested.

DESCRIPTORS: white cheese, *Salmonella*, Antibiotic Sensibility

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENENSON, A S. Salmonellosis in: El Control de las Enfermedades Transmisibles en el Hombre Washington D. C: (OSP-Publicación Científica, 538), Organización Panamericana de la Salud, p. 458 – 63, 1992.
2. CALZADA, C.T., NEME, S.N., IRINO, K., KANO, E., DIAS, A.M.G., FERNANDEZ, S.A., VAZ, T.M.I., PESSOA, G.V.A., Sorotipos de *Salmonella* identificados no período de 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.44, n.1, p.1-8, 1984.

3. CARMO, L.S & BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Revista de Microbiologia*, v.21, n.4, p.320 – 323. 1990.
4. CARMO, L.S. do.; VIEIRA, C.A.; REIS, D'ARC.P. dos. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, v.27, p.122-25, 1996.
5. CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; FONSECA, L.M. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo minas frescal em Pará de Minas. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia*, v.46, n.6, p.723-728. 1994.
6. DIAZ DE AGUAYO, M.E.; LEON DUARTE, A. B. & MONTES DE OCA CASTILHO. Incidence of multiple antibiotic resistant organisms isolated from retail milk products in Hemosillo, México. *Journal of Food protection*, v.55, n.5, p.370 – 373, 1992.
7. GUSTAFSON, R., H. Use of antibiotics in livestock and human health cancers. *Journal Dairy Science*, v.74, n.4, p.1428 – 1432, 1991.
8. PAPADOPOULOU, C.; MAIPA, V.; DIMITRIU, D.; PAPPAS, C.; VOUTSINAS, L. MALATOU, H. Behaviour of *Salmonella enteritidis* during the manufacture, ripening, and storage of feta cheese made from unpasteurized ewe's milk. *Journal of Food Protection*, v.56, n.1 p. 25-8, 1993.
9. SANTOS, E.C.; GENIGEORGIS, C. & FARVERT, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian minas cheese. *Journal Food Protection*, v.44, n.3, p.177 – 178. 1981.
10. SANTOS, F.A.; NOGUEIRA, N. A.; & CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo "coalho" comercializado em Fortaleza (CE). *Boletim do CEPPA*, v.13, n.1, p.31-36. 1995.
11. M.C.C.; CASTRO, D.G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo "Minas". in: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13, 1995, Juiz de Fora (MG). ILCT, 1995, p.145 – 147.
12. SCHOTHORST, M.V. RENAUD, A M. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified rappaport's medium (R10). *Journal of Applied Bacteriology*, v.54, n.2, p.209-215, 1983.
13. TAVARES, W. Resistência Bacteriana. *Manual de Antibiótico para Estudantes de Medicina*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988, p.81-98.
14. RABULSI, L.R. *MICROBIOLOGIA*, Rio de Janeiro. Livraria Atheneu Editora, 2ed. 1991. 386p.
15. VALQUEZ-MORENO, L. Antibiotic residues and drug resistant bacteria in beef and chicken tissues. *Journal Food Science*, v.55, n.3, p.632-634, 1990.
16. VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.T. *COMPENDIUM FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS*, Washington. DC- American Public Health Association. 1992. 1219p.

Recebido para publicação em 22/12/97

