

# Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal.

## Fecal coliforms, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Minas frescal cheese.

Patricia Maria Rocha Gonçalves<sup>1</sup>; e Robson Maia Franco<sup>2</sup>.

### Resumo

Trinta amostras de queijo frescal foram obtidos em estabelecimentos da cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, e submetidas às seguintes análises bacteriológicas: pesquisas de *Salmonella*, enumeração de coliformes fecais e contagem de *Staphylococcus aureus*. O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação higiênico-sanitária desse produto. Das 30 amostras analisadas, nenhuma espécie de *Salmonella* foi isolada. Na enumeração de coliformes fecais, 28 (93,33%) amostras apresentaram número mais provável (NMP) > 1100/g, uma (3,33%) apresentou NMP = 1100/g e uma (3,33%) com NMP = 21/g. Na contagem de *S. aureus*, 15 (50%) amostras foram positivas, sendo que 12 (40%) apresentaram valores acima de 10<sup>3</sup>/g e uma (3,33%) apresentou valor acima de 10<sup>6</sup>. Concluiu-se que maior atenção deve ser tomada pelas autoridades sanitárias, uma vez que a maioria das amostras se encontrava em condição higiênico-sanitárias insatisfatórias.

**Palavras-chave:** queijo Minas frescal, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, coliformes fecais

### Introdução

Os produtos de origem animal têm notável importância na alimentação da população devido à sua constituição nutricional, assim como na economia do país, pela sua comercialização interna ou de exportação. Portanto, as condições de qualidade e sanidade dos alimentos se refletirão em todo o âmbito social, desde as doenças transmissíveis ao homem por alimentos, até mesmo a perda de suas características, levando assim a prejuízos financeiros pela rejeição do produto.

O queijo tipo Minas é considerado um produto de ampla aceitação comercial e se faz presente nos hábitos alimentares de nossa população. Apesar da legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado para o preparo do mesmo, é intensa a comercialização do produto não obediente à especificação legal (Pereira et al., 1991).

A ingestão de queijos em condições inadequadas de consumo pode trazer graves conseqüências para a população, sendo portanto um problema de Saúde Pública; vários são os relatos de toxinfecção alimentar devido ao consumo de queijos.

Em conformidade com o anexo I da Portaria 001 do DINAL Brasil (1987), foram estabelecidos os padrões microbiológicos aprovados para queijo frescal tendo por base as seguintes análises: ausência de salmonelas em 25g, número mais provável (NMP) máximo de 10<sup>2</sup>/g para coliformes fecais e NMP ou contagem direta (máximo) de 10<sup>3</sup>/g para *Staphylococcus aureus*, objetivando levar ao consumidor um produto de melhor qualidade higiênico-sanitária.

As salmonelas são fracas competidores quando na presença de uma microbiota variada no alimento (Roitman et al., 1988). Elas se encontram com frequência debilitadas fisiologicamente, por isso sua análise requer diferentes métodos (Flowers et al., 1992). De acordo Calderon e Furlanetto (1991), a interação do meio seletivo de enriquecimento, temperatura e tempo de incubação, seria fundamental para o isolamento de salmonelas.

No grupo dos coliformes fecais, a *Escherichia coli* e seus diversos sorotipos, são os organismos que exercem importância do ponto de vista higiênico-sanitário, podendo ainda determinar quadros de diarreia em crianças e idosos, como também em indivíduos imunodeprimidos ao ingerirem alimentos que veicularem tal microrganismo (Hitchins et al., 1992).

O crescimento de *S. aureus* em alimentos indica um risco potencial à Saúde Pública, principalmente se há número de células compatível com a produção de enterotoxinas que, se ingeridas, causam intoxicação alimentar (ICMSF, 1983). Segundo Franco e Almeida (1992), a presença de *Staphylococcus* sugere condições inadequadas de manipulação, limpeza e desinfecção. Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processo moderados de temperatura, as enterotoxinas são termoestáveis, resistentes a temperaturas normalmente utilizadas no processamento de produtos lácteos (Freitas e Magalhães, 1990).

<sup>1</sup> - Graduanda em Medicina Veterinária estagiária do Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64 - 24230-340 - Niterói - RJ.

<sup>2</sup> - Professor Adjunto IV do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da UFF, Rua Vital Brazil Filho, 64, - 24230-340 - Niterói - RJ.

É importante ressaltar que o queijo é um dos alimentos comumente associados com intoxicação alimentar estafilocócica (Lancette e Tatini, 1992). Sabioni et al. (1994) citam casos de intoxicação estafilocócica causada por queijo Minas frescal. Anunciação et al. (1994) relatam a presença de enterotoxina estafilocócica também em queijo Minas Frescal. Apesar de ser quase incomum a fatalidade da intoxicação alimentar estafilocócica, ela ocorre ocasionalmente em crianças muito novas e idosos que estejam sofrendo de outras doenças (Cerqueira-Campos et al., 1993).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação higiênica-sanitária do queijo Minas frescal, pelo fato deste ser um produto de grande consumo nacional, e demonstrar possíveis falhas que estejam ocorrendo durante o seu processamento e/ou comercialização, alertando os órgãos vigilantes competentes para que medidas necessárias para evitá-las sejam tomadas, porque a presença de microorganismos que alteram a qualidade e o prazo de vida comercial do produto, leva à perdas econômicas significativas.

### Material e Métodos

As amostras a granel foram adquiridas em estabelecimentos comerciais do município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro. Foram utilizadas 30 amostras, inspecionadas, embaladas individualmente em sacos plásticos, pesando cada um aproximadamente 200 gramas e mantidas sob refrigeração até o momento das análises. Em condições de assepsia, eram pesadas em duas subamostras de 25 gramas cada.

Uma subamostra de cada amostra era colocada em copo homogeneizador contendo 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% (SSP 0,1) (Mossel e Quevedo, 1967) e em seguida era homogeneizada em "Waring blender" durante 2 minutos em baixa rotação, obtendo-se então a diluição  $10^{-1}$ . Posteriormente, era pipetado 1 mL desta diluição para um tubo contendo 9 mL de SSP 0,1%, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$  e tal procedimento era repetido para obtenção das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , partindo-se das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  respectivamente.

Pesquisa de *Salmonella* (Brasil, 1981 e Flowers et al., 1992): a subamostra era colocada em balão contendo 225 mL de água peptonada tamponada (APT), homogeneizada e incubando-se a 35-37°C por 24 horas. Após homogeneização da APT, foram pipetados 2 mL de APT e transferiu-se 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Caldo Selenito-Cistina (Merck 7709) e 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Caldo Tetrionato (Merck 5285), onde previamente foram adicionados 0,2 mL de solução de iodo-iodurada. Os tubos foram incubados a 35-37°C por 24 horas. O subcultivo crescido na fase anterior foi inoculado em placas com Agar Verde Brilhante (Merck 7237) e Agar Bismuto Sulfito segundo Wilson-Blair (Merck 5418) que

eram incubadas invertidas a 35-37°C por 24 horas. As UFCs típicas e isoladas eram semeadas em tubos contendo meio agar TSI (Merck 3915) e LIA (Merck 11640), inclinados, que eram incubados a 35-37 °C por 18 a 24 horas. A partir dos cultivos que se comportaram como *Salmonella* na TSI e LIA, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: lisina, arginina, ornitina, urease, malonato-fenilalanina, indol, vermelho de metila e Voges Proskauer.

Enumeração de coliformes fecais (Hitchins et al., 1992): a partir das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , foi transferido 1 mL para tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato (Merck 10266) com tubo de Durham invertido. Para cada diluição utilizou-se três tubos do já referido caldo, obtendo-se três séries de três tubos, que foram incubados a 35-37 °C por 24-48 horas. Os subcultivos positivos foram semeados em tubos contendo 10 mL de Caldo EC (Merck 10765) com tubo de Durham invertido, incubando-os a  $44,5 \pm 0,5$  °C por 24 horas em estufa de camisa dupla. Realizou-se o cálculo do NMP conforme tabela de MacCrady, a partir dos tubos positivos. Em seguida, os tubos positivos foram semeados em placas contendo meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) segundo Levine (Merck 1342). Essas placas foram incubadas invertidas a 35-37 °C por 24 horas. A partir das UFCs típicas e isoladas de *E. coli* crescidas no meio EMB, foram realizadas as provas bioquímicas de IMViC; (indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato).

Contagem de *S. aureus* (Lancette e Tatini, 1992, Kloos e Scheleifer, 1986): das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , depositou-se 0,1 mL de cada diluição sobre a superfície de Agar Baird-Parker (Merck 5406) em placas de Petri em duplicata e com auxílio de bastão tipo "hockey" flambado, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio até completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 35-37 °C por 24-48 horas.

Foram selecionadas placas contendo entre 20 e 200 UFCs, contando-se as UFCs típicas e isoladas. A partir delas, foram confeccionados esfregaços corados pelo método de Gram, verificando-se a presença de cocos Gram positivos. Três UFCs típicas e isoladas foram repicadas para tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) Merck 10493), sendo incubados a 35-37 °C por 24 horas. As seguintes provas bioquímicas foram executadas a partir do subcultivo crescido em caldo BHI, conforme Kloos e Scheleifer (1986): desoxirribonuclease, catalase, gelatinase, oxidação e fermentação da glicose respectivamente em aerobiose e anaerobiose, oxidação e fermentação do manitol respectivamente em aerobiose e anaerobiose, coagulase e termonuclease.

### Resultados

Bactérias do gênero *Salmonella* não foram isoladas em 100% das amostras analisadas.

Todas as amostras foram positivas para coliformes fecais. De 30 amostras, 28 (93,33%) apresentaram NMP > 1100/g. Destas, em 26 amostras a espécie isolada foi a *E. coli* (24 típicas e duas atípicas) e em 2 amostras foi a *E. blattae*. Uma (3,33%) amostra apresentou NMP = 1100/g e outra (3,33%) NMP = 21/g., sendo a *E. coli* (típica) a espécie isolada em ambas.

Quinze (50%) amostras foram positivas para *S. aureus*; a contagem pode ser observada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Contagem de *Staphylococcus aureus*

| UFCs/grama                                    | Número de amostras (%) |
|---|------------------------|
| 5,0 x 10                                      | 1 (6,67)               |
| 2,5 x 10 <sup>2</sup>                         | 1 (6,67)               |
| 1,0 x 10 <sup>3</sup> a 5,6 x 10 <sup>3</sup> | 8 (53,33)              |
| 1,0 x 10 <sup>4</sup> a 2,1 x 10 <sup>4</sup> | 4 (26,67)              |
| 1,2 x 10 <sup>6</sup>                         | 1 (6,67)               |
| Total   | 15 (100)               |

### Discussão e Conclusões

Roitmam et al. (1988) citam que o não isolamento de bactérias do gênero *Salmonella* supõe a presença de microbiota variada, particularmente bactérias lácticas, produtoras de proteases e lipases, proporcionando transformações bioquímicas que tornam o meio adverso a sobrevivência de microrganismos patogênicos. Neste trabalho não foram isoladas salmonelas, portanto os nossos resultados estão de acordo com os autores acima mencionados, sugerindo que as bactérias lácticas presentes na amostra possam ter inibido as salmonelas. Além disso, essas bactérias em alimentos geralmente se encontram em número baixo e frequentemente em um estado fisiológico debilitado devido à exposição a condições estressantes durante o processamento e estocagem (Flowers et al., 1992), o que nos parece, também, ser um fator limitante ao seu crescimento.

A interação do meio seletivo de enriquecimento, temperatura e tempo de incubação seriam determinantes fundamentais para melhor isolamento dessas bactérias. Calderon e Furlanetto (1991) verificaram melhores resultados quando o Caldo Tetracionato era incubado a 43 °C por 48 horas. Entretanto, no presente trabalho, os Caldos Tetracionato foram incubados a 35-37 °C por 24 horas, devido a expectativa de isolarmos germes que tivessem a capacidade de colonizar o trato intestinal de consumidores deste tipo de alimento.

Segundo Hitchins et al. (1992), a presença de coliformes fecais que são indicadores de contaminação fecal, demonstra manipulação incorreta no

processamento, transporte e/ou comercialização, e também que os microrganismos autóctones do leite que participam da microbiota do queijo frescal, não exerceram ação impediante ao desenvolvimento dos coliformes fecais, o que por nós é corroborado através dos valores do NMP para coliformes fecais deste trabalho, revelando que em 30 amostras, 29 (96,67%) apresentaram número superior a 10<sup>2</sup>/g.

Franco e Almeida (1922) relatam que em alimentos crus, a incidência de *S. aureus* é reduzida devido à competição entre os microrganismos presentes, porém sua presença sugere condições inadequadas de manipulação, limpeza e desinfecção uma vez que são indicadores destas. Tal aspecto foi por nós detectado em apenas cinco amostras onde obtivemos resultados acima dos padrões microbiológicos estabelecidos, pela ocorrência de *S. aureus*.

Os números de células compatíveis com o início da produção de enterotoxina são valores próximos a 10<sup>5</sup> UFCs/g, porém 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> UFCs/g já significam risco à Saúde Pública (ICMSF, 1983). No presente trabalho, uma amostra apresentou valor acima de 10<sup>6</sup> UFCs/g, sugerindo que esta amostra poderia conter enterotoxina estafilocócica, concordando com Sabioni et al. (1994) onde citam que em alimentos, valores acima de 10<sup>6</sup> UFCs/g implicam em alto risco de intoxicação alimentar. Isto ainda é confirmado por Anunciação et al. (1994) que relatam a presença de enterotoxina estafilocócica em amostras que apresentam contagem de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFCs/g.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

1 - A ausência de bactérias do gênero *Salmonella* demonstra que esse produto é de baixo potencial para determinar casos de infecção alimentar causados por esse agente.

2 - As amostras positivas para coliformes fecais demonstram as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias do produto, indicando sua contaminação direta ou indiretamente com matéria fecal, estando este em desacordo com os padrões legais vigentes e conforme os resultados obtidos, 29 (96,67%) amostras seriam consideradas impróprias para consumo segundo o anexo II da portaria 001 do DINAL (Brasil, 1987).

3 - A presença de *S. aureus* indica que cinco amostras estavam em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e em desacordo com os padrões legais vigentes, sendo considerados produtos potencialmente capazes de causar toxinfecções alimentares e uma amostra estaria imprópria para o consumo, conforme anexo II da portaria 001 do DINAL (Brasil 1987).

4 - Devido às amostras positivas para *S. aureus*, supõe-se que o tratamento térmico não está cumprindo suas finalidades, que esteja ocorrendo contamina-

ção após o processamento devido ao contato humano ou com superfícies são sanitizadas, ou da mistura com leite não pasteurizado, entretanto a prova da fosfatase não foi executada no leite para verificar a eficiência da pasteurização, uma vez que as amostras eram inspecionadas, e de acordo com o Artigo 600 parágrafo 2º do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952), só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir do leite pasteurizado.

5 - Maior atenção deve ser tomada pelas autoridades sanitárias, uma vez que tais situações comprometem a qualidade, o prazo de vida comercial do produto, alteram suas qualidades organolépticas e põem em risco a saúde do consumidor.

#### Abstract

**Fecal coliforms, *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Minas frescal cheese.**

Thirty samples of Minas frescal cheese sold by establishment in Niterói City, State of Rio de Janeiro, were submitted to bacteriological analysis for: research of *Salmonella*, the most probably number (MPN) of fecal coliforms and counting of *Staphylococcus aureus*. The principal objective was the hygienic-sanitary valuation of this product. No one of the samples showed any specimen of *Salmonella*. About the MPN of fecal coliforms, 28 (93,33%) samples had values of MPN higher than 1100/g, one (3,33%) sample had value of MPN = 1100/g and one (3,33%) sample had value of MPN = 21/g. On counting of *S. aureus*, 15 (50%) samples were positive, 12 (40%) samples with a count above  $10^3/g$  and one (3,33%) sample a count above  $10^6$ . It can be concluded that the sanitary authorities should pay attention, to the fact that a large percentage of samples were in unsatisfactory hygienic-sanitary conditions.

**Key words:** Minas frescal cheese, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, fecal coliforms

#### Referências Bibliográficas

- ANUNCIACÃO, L. L. C., LINARDI, W. R., CARMO, L.S., BERGDOLL, M. S. Production of Staphylococcal Enterotoxin A in white cheese *R. Microbiol.*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 68-71, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo decreto nº 30691 de 29/03/52, alterado pelo decreto nº 1255 de 25/06/62. Rio de Janeiro, 1952. 174p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de animal e seus ingredientes origem: 1 - Métodos Microbiológicos*. Brasília, 1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL. *Padrões Microbiológicos para produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo*. Portaria nº 001 de 28 de janeiro de 1987. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, p. 2197-2200, 12 de fevereiro de 1987, Seção I.
- CALDERON, D. F., FURLANETTO, S. M. P. Isolamento de *Salmonella* em diferentes meios seletivos de enriquecimento, tempos e temperaturas de incubação. *R. Microbiol.*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 127-130, 1991.
- CERQUEIRA-CAMPOS, M. L., FURLANETTO, S. M. P., IARIA, S. T., BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning outbreaks in São Paulo (Brazil). *R. Microbiol.*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 261-264, 1993.
- FLOWERS, R. S. D'AOUST, J. Y., ANDREWS, W. H., BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3. ed. Washington: APHA, 1992. 1912 p. Cap. 25, p. 371-422.
- FRANCO, R. M., ALMEIDA, L. E. F. Avaliação Microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 6, n. 21, p. 33-36, mar. 1992.
- FREITAS, M. A. Q., MAGALHÃES, H. Enterotoxigenidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. *R. Microbiol.*, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, 1990.
- HITCHINS, A. D., HARTMAN, P. A., TODD, C. D. Coliforms - *Escherichia coli* and its toxins. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*. 3. ed. Washington: APHA, 1992, 1912 p. Cap. 24, p. 325-345.
- INTERNACIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. *Microorganismos de los Alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acibria, 1983. 2 v. v. 1: Técnica de análises microbiológico. 341 p.
- KLOS, W. E., SCHELEIFER, K. H. Genus IV *Staphylococcus*. In: SNEATH, P.H.A., HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Willians and Wilkins, 1986. 2v. v.2, p. 1013-1035.

LANCETTE, G. A., TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In : VANDEZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3. ed. Washington : APHA, 1992, 1912 p. Cap. 33, p. 533-547.

MERCK, E. *Manual de Medios de Cultivo* - Division Diagnósticos. Barcelona, 1990.356p.

MOSSEL, D. A. A., QUEVEDO, F. *Control Microbiológico de los alimentos: Métodos recomendados*. Lima: Universidade Nacional Mayor de San Marcos, 1967. 96p.

PEREIRA, M. L., LARA, M. A., DIAS, R.S., CARMO, L. S. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". *R. Microbiol.*, São Paulo, v. 22, p. 349-350, 1991.

ROITMAM, I., TRAVASSOS, L.R., AZEVEDO, J. L. *Tratado de Microbiologia*. 3. ed. São Paulo : Manole, 1988.

SABIONI, J. G., NASCIMENTO, D., PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG), 1992. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, set. 1994.



**Laboratórios**

**BIORIORED PRODUTOS E EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.**

Rua Nicarágua, 370 - Sl.s. 307/308

CEP 21020-050 - Penha - Rio de Janeiro - RJ

Fax/Fone: (021) 290-6664 - Fax: (021) 280-6135