

PRESENÇA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM QUEIJOS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE URUAÇU-GOIÁS

Karla Mariana Lemos de Oliveira¹
João Batista de Carvalho²
Leonice Paraguai dos Santos Ramos³
Luciane Cristina Gelatti⁴

RESUMO: O estudo objetivou verificar a presença de *Staphylococcus aureus* através do isolamento em uma amostragem de queijos artesanais comercializados na Feira Livre do Município de Uruaçu, Goiás. Os resultados observados no presente estudo demonstram que todas as amostras analisadas encontram-se com valores bem distantes dos recomendados, conforme descrito na RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que é de 1.10^3 UFC/g do alimento.

Palavras-chave: Queijo. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT: The study aimed to verify the presence of *Staphylococcus aureus* by isolating it from a samples of handmade cheeses sold in the Local Market of Uruaçu, Goiás. The results observed in this study demonstrate that all samples analyzed have a much higher quantity of bacteria than the recommended as described in the Resolution RDC nº 12 of January 2, 2001, which is 1.10^3 CFU/g of food.

Keywords: Cheese . *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus aureus* é uma das causas mais frequentes de infecções hospitalares e em ambientes de comunidade, podendo apresentar altos valores de morbidade e mortalidade. Encontra-se presente na microbiota natural dos seres humanos e também de animais. As infecções atribuídas a este microrganismo podem ser simples como o furúnculo, contudo

¹Graduada em Farmácia pela Faculdade Serra da Mesa (FASEM), Uruaçu-Goiás. E-mail: karlalemos@hotmail.com.

²Graduando em Farmácia pela Faculdade Serra da Mesa (FASEM), Uruaçu-Goiás. E-mail: joabatistacar3@hotmail.com.

³Graduada em Química pelo Instituto Federal de Goiás (IFG), Campus Uruaçu-Goiás, professora da Faculdade Serra da Mesa (FASEM), Uruaçu-GO. E-mail: leoniceparaguay@hotmail.com.

⁴Mestra em Patologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e professora da Faculdade Serra da Mesa (FASEM), Uruaçu-GO. E-mail: luciane.gelatti@fasem.edu.br.

podem causar em indivíduos com o sistema imunológico comprometido doenças mais graves, a exemplo de endocardite, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, meningite, pneumonia comunitária e hospitalar e, infecções devido ao uso de cateteres (FERREIRA et al., 2009; CORREAL et al., 2013).

A ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas produzidas por *S. aureus* ocasiona a intoxicação alimentar estafilocócica, uma das doenças mais comuns no caso da referida bactéria. A manipulação dos alimentos por indivíduos com a presença da bactéria em suas mãos destaca-se como a principal fonte de contaminação dos produtos alimentares. Cabe ainda destacar a resistência das células bacterianas a altas temperaturas e a presença de considerável teor de sal. A doença é de efeito abrupto aparecendo como sintomas: diarreia, vômito, cefaleia, náuseas, dores abdominais, suor excessivo e em alguns casos desidratação, aproximadamente trinta minutos após a ingestão, com duração aproximada de um dia. Mesmo não sendo considerada como uma doença de grande gravidade, em pessoas idosas, imunossuprimidos e crianças de pouca idade podem ser fatais (FERREIRA et al., 2010; BRASIL, 2014).

O queijo produzido de forma artesanal é considerado como um dos principais causadores de intoxicação alimentar estafilocócica. Esses dados refletem a sua composição, assim como a forma com que é produzido, de forma totalmente manual. Além disso, animais bovinos são acometidos por uma infecção no úbere denominada mastite, oriunda de isolados bacterianos de *S. aureus*, contaminando assim o leite, matéria prima do queijo. O grande consumo desse alimento artesanal se deve a boa parte da população o considerar como mais saboroso e saudável do que os industrializados (KOMATSU et al., 2010).

O queijo é um produto altamente apreciado no Brasil, sendo o consumo constantemente visível em casas, restaurantes, padarias ou bares. Deve-se considerar ainda que na sua grande maioria o queijo é degustado *in natura*, não sendo realizado nenhum tipo de assepsia para eliminação de microrganismos. Dentre os microrganismos que podem estar presente em queijos, destacam-se os isolados de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria responsável pela maioria das intoxicações alimentares, causando sintomas desagradáveis como vômitos e diarreias, podendo desencadear também doenças mais graves como endocardite (FILHO et al., 2007).

Neste contexto, o presente trabalho, objetivou verificar a presença de *Staphylococcus aureus* através do isolamento em uma amostragem de queijos artesanais comercializados na Feira Livre do Município de Uruaçu, Goiás, para o conhecimento da presença local desse microrganismo em um produto altamente produzido e comercializado nessa cidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local do estudo

O presente estudo foi realizado na Feira Livre do Município de Uruaçu, cidade localizada no norte do estado do Goiás, com população estimada, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 39.483 habitantes. O município em destaque possui duas feiras de produtores semanais (quarta-feira e domingo), que comercializam o queijo. As aquisições de amostras ocorreram apenas no comércio de domingo.

5.2 Amostra em estudo

Amostras de queijo fresco produzidos de forma artesanal por produtores do Município de Uruaçu e comercializadas na Feira Livre local. Foram analisadas 8 unidades de queijo minas frescal, adquiridas de forma individual e de 8 produtores distintos, que comercializam os mesmos na feira livre, que ocorre aos domingos, no município de Uruaçu-Goiás. Cada amostra foi representada por um produto (uma unidade de queijo), as quais receberam uma etiqueta com o número correspondente.

5.3 Período do estudo

A coleta de amostras para o estudo ocorreu no período de agosto a dezembro de 2015.

5.4 Coleta das amostras

A coleta das amostras ocorreu aos domingos, em horário estabelecido pelos pesquisadores, compreendido entre 06 e 08 horas da manhã, horário de início das comercializações. As amostras permaneceram em suas embalagens originais e foram acondicionadas *in house* em refrigerador, e posteriormente, transportadas até o Laboratório de Microbiologia da Faculdade Serra da Mesa (FASEM), onde foram mantidas refrigeradas até o momento da realização dos procedimentos microbiológicos.

5.5 Procedimentos microbiológicos

5.5.1 Preparação das amostras

Previamente à abertura das embalagens contendo o produto, fez-se assepsia da área externa com álcool etanol 70%, para remover os contaminantes presentes, assim como da bancada de trabalho. A unidade analítica de 25 gramas de amostra de queijo fresco foi transferida para o frasco de trituração previamente esterilizado.

5.5.2 Contagem de colônias de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de colônias de *Staphylococcus aureus* presente nos queijos artesanais, foi necessária a obtenção de diluições nas proporções 10^1 , 10^2 e 10^3 em duplicata. O procedimento foi realizado da seguinte forma: para a obtenção da solução 10^1 pesou-se 25 gramas de diferentes partes da amostra, onde a mesma foi macerada em um gral adicionando a seguir 225 mL de uma solução salina peptonada estéril. A solução obtida desse procedimento foi acondicionada em um tubo com a devida identificação. Para a obtenção da diluição 10^2 tomou-se 1 mL da diluição 10^1 e adicionou em um tubo de vidro onde foi acrescentado 9 mL de solução salina peptonada estéril. Para a diluição 10^3 tomou-se 1 mL da diluição 10^2 e acrescentou-se 9 mL de solução salina peptonada estéril (BRASIL, 2001).

Após o procedimento de diluição da amostra, em 3 placas de ágar Baird Parker foi inoculado na superfície 0,1 mL das diluições, sendo cada placa com a referida diluição. Com o auxílio da alça de Drigalski distribuiu-se os inóculos por toda a superfície do meio de cultivo, deixou-se secar por alguns instantes. Posteriormente, as placas de cultura foram transferidas para a estufa microbiológica, numa temperatura de 37°C por um período de 48 horas. No término do tempo determinado foi realizada a leitura da contagem de colônias de cada unidade amostral. A contagem de colônias foi feita com auxílio de uma lupa. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mL da amostra foi calculado multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada (BRASIL, 2001).

O ágar Baird Parker utilizado nesse procedimento é recomendado para o isolamento e enumeração de isolados de *Staphylococcus aureus* em amostras de alimentos e produtos cosméticos. O ágar possui em sua composição as fontes de carbono e nitrogênio necessárias para o crescimento de *S. aureus*. A glicina, o cloreto de lítio e o telurito de potássio atuam como agentes seletivos. Os estafilococos produzem colônias preto-acinzentadas devido à capacidade de reduzir o telurito (BD, 2006).

5.5.3 Identificação de *Staphylococcus aureus*

Para a identificação de *Staphylococcus aureus*, foram utilizadas as seguintes provas: coloração de Gram e detecção da coagulase. Através da metodologia de Gram, colônias típicas (colônias preto-acinzentadas), oriundas do ágar Baird Parker foram classificadas com base na sua morfologia e características tintoriais, as quais foram observadas microscopicamente. Foram utilizadas como controle para esta coloração as seguintes cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Bacilos Gram-negativos) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Cocos Gram-positivos). Através da prova da coagulase foi verificada a habilidade do

organismo em coagular o plasma pela ação da enzima coagulase (estafilocagulase). Essa etapa foi realizada através da metodologia em tubo (pesquisa da coagulase livre), utilizando plasma de coelho liofilizado, da marca Laborclin. Foi colocado 0,5 mL de plasma reconstituído em um tubo de ensaio e acrescentado uma alçada da colônia pura isolada em ágar sangue (meio de cultura não seletivo) e incubado por 35 °C. As leituras foram realizadas após 4 e 24 horas de incubação. Foram utilizadas como controle as cepas: ATCC *S. aureus* 25923: positiva e *S. epidermidis* ATCC 12228: negativa (ZOCOLI; TOBOUTI; SINTO, 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de 4 meses, foram analisadas oito (8) amostras de queijo minas frescal produzidas de forma artesanal e comercializadas na Feira do Município de Uruaçu-Goiás. As contagens de colônias obtidas foram: amostra 1 - $1,2 \cdot 10^5$, amostra 2 - $6,1 \cdot 10^5$, amostra 3 - $8,4 \cdot 10^5$, amostra 4 - $9,8 \cdot 10^5$, amostra 5 - $9,9 \cdot 10^5$, amostra 6 - $8,6 \cdot 10^5$, amostra 7 - $14 \cdot 10^5$, amostra 8 - $7,3 \cdot 10^5$. Das oito amostras analisadas (100%), as quantificações de *S. aureus* obtidas demonstraram estar em desacordo com os valores preconizados pelo Ministério da Agricultura, que estabelece na Portaria RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, como padrão microbiológico legal para *Staphylococcus* coagulase positivo, o máximo $1 \cdot 10^3$ UFC/g. Todas as colônias típicas oriundas do ágar Baird Parker foram positivas para o teste da coagulase.

O presente estudo possibilitou demonstrar a presença de altas contagens de colônias de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo artesanal, produzidas e comercializadas na Feira Livre do Município de Uruaçu e oriundas de distintos produtores.

Muitos são os relatos sobre a elevada contaminação de queijos, principalmente queijos frescos por *Staphylococcus aureus*. O estudo conduzido por Filho e Filho (2000) verificaram a presença de *Staphylococcus aureus* em uma amostra de queijo minas frescal comercializado na cidade de Poços de Caldas, Minas Gerais. Os pesquisadores evidenciaram que das 80 amostras de queijo minas adquiridas na feira e no mercado municipal, 40 (50,0%) apresentaram contagens de *Staphylococcus aureus* acima de 10^3 UFC/g, com valores em torno de 10^5 UFC/g. Os dados obtidos, conforme descrito pelos autores seria esperado, visto que a manutenção do produto em temperatura ambiente foi evidenciada durante todo o período de comercialização, assim como no presente estudo. Importante salientar as altas temperaturas observadas na cidade de Uruaçu, para os meses estabelecidos para a coleta, ultrapassando os 30°C.

Outro estudo, na cidade de Goiânia, determinou a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas tipo frescal e padrão comercializados nas feiras livres da capital goiana. No período de maio a setembro de 2005, foram analisadas 84 amostras (42 de queijo minas frescal e 42 de minas padrão), oriundas de 21 feiras livres distribuídas pela cidade. Os valores médios de contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijos frescais foram: $6,3 \cdot 10^4$; $9,3 \cdot 10^4$; $3,8 \cdot 10^3$ e $5,6 \cdot 10^4$ UFC/g. As referidas enumerações são inferiores as contagens obtidas no presente estudo, porém ambas encontra-se fora dos limites preconizados pela ANVISA, representando assim perigo aos consumidores (ARRUDA et al., 2007).

Souza e colaboradores (2011) demonstraram que 93,3% das amostras de queijos analisadas foram consideradas insatisfatórias, apresentando colônias de *S. aureus* acima dos padrões legais vigentes. Porém, nesse estudo as 30 amostras de queijo minas artesanal verificadas, pertenciam a uma mesma marca registrada no Instituto Mineiro de Agropecuária, no entanto os lotes estudados eram diferentes.

Estudo mais recente, conduzido por Ferreira e colaboradores (2011), avaliou a qualidade microbiológica do queijo minas frescal artesanal, através da análise da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Foram analisadas 20 amostras comercializadas em feiras livres da cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Os resultados obtidos mostraram que aproximadamente 90% das amostras estavam com contagens acima do padrão estabelecido para *S. aureus*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de fazer parte da microbiota normal dos seres humanos, o *S. aureus* é considerado como um dos agentes patológicos principais dos surtos de intoxicação alimentar. A sua presença no leite e em seus derivados, como o queijo, unidade amostral de nosso estudo, pode sugerir a utilização de matéria-prima proveniente de animais infectados (mastite) ou a possibilidade de contaminação dos manipuladores.

Os resultados observados no presente estudo demonstram que todas as amostras analisadas encontram-se com valores bem distantes dos recomendados, conforme descrito na RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que é de $1 \cdot 10^3$ UFC/g do alimento. Considerando os valores preconizados pela ANVISA, no que tange a contagem de *S. aureus*, conclui-se que as amostras de queijo minas frescal artesanal comercializadas na feira livre do município de Uruaçu-Goiás, estão impróprias para o consumo humano. Adicionalmente, com base no que foi relatado, acredita-se que esses achados sejam extremamente preocupantes, principalmente

pelo fato destes valores estarem muito próximos dos requeridos (10^5 UFC/g a 10^9 UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas, para a produção de enterotoxinas em quantidades suficientes e necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Os resultados desse estudo sugerem práticas inadequadas, provavelmente, em todos os níveis da produção queijeira, incluindo a possibilidade de uma ordenha sem a higiene necessária e/ou um acondicionamento impróprio, assim impossibilitando a obtenção de uma matéria prima com qualidade, à linha de produção e a comercialização. Contudo, fica indispensável salientar a necessidade de vigilância pelos órgãos competentes a toda a cadeia produtiva, inclusive à feira livre, local onde o produto encontra-se em temperatura ambiente durante a comercialização. Com essas medidas, se possibilitará um alimento com qualidade e segurança para a população consumidora.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – **RDC n° 12. De 02 de janeiro de 2001.** 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 22 de outubro de 2015.
- ARRUDA, Marcele Louise et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** São Paulo, v. 66, n.3, 2007. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n3/v66n3a13.pdf>>. Acesso em: 21 de novembro de 2015.
- BD. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO. **Meios em placas prontos a usar.** 2006. Disponível em: <<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-255084.pdf>>. Acesso em: 12 de novembro de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos–VE-DTA.** 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 23 de setembro de 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa.pdf> . Acesso em: 12 de novembro de 2015.
- CORREAL, Júlio et al. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto.** Rio de Janeiro, v.12, n.3, p.31-46, 2013. Disponível em: <<http://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/7529/5911>>. Acesso em: 21 de setembro de 2015.
- FERREIRA, Gisele Barreto et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “Minas frescal” comercializados na região do triângulo mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública.** Salvador, v.34, n.3, p.575-589. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-0233/2010/v34n3/a2066.pdf>>. Acesso em: 18 de setembro de 2015.
- FERREIRA, Renata Marques et al. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET.** Londrina, v. 5, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/72aef9618590756ec693d24b9a1eddad.pdf>>. Acesso em: 15 de novembro de 2015.
- FERREIRA, William Antunes et al. Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. **Revista de Patologia Tropical.** Goiânia, v.38, n.2, 2009. Disponível em: <https://portais.ufg.br/up/63/o/2009_38_2_83_92.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2015.

FILHO, Antonio Nader et al. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n.5, p.1316-1318, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n5/a32v59n5.pdf>>. Acesso em: 23 de setembro de 2015.

FILHO, Edvaldo Sampaio de Almeida; FILHO, Antonio Nader. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 34, n. 6, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v34n6/3570.pdf>>. Acesso em: 15 de novembro de 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Demográfico, 2010**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/link.php?uf=go>>. Acesso em: 05 de março de 2015.

KOMATSU, Raquel Satomi et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience**. Uberlândia, v.26, n. 2, 2010. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewArticle/7159>. Acesso em: 21 de setembro de 2015.

OPLUSTIL, Carmem Paz; ZOCCOLI, Cássia Maria; TOBOUTI, Nina Reiko. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. Ed. Sarvier. 2 ed. São Paulo.

SOUZA, Viviane de et al. Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo minas artesanal. **Higiene Alimentar**. v. 25, n. 194/195, p. 894-896, 2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41149/1/RAC-Characterizacao-de-estirpes.pdf>>. Acesso em: 13 de novembro de 2015.