UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

ROSELIA ODETE JUSTINO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. E TERMOTOLERANTES ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO.

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

ROSELIA ODETE JUSTINO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. E TERMOTOLERANTES ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.
Orientador: Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado
Co orientador: Dra. Michelle Rose de Oliveira Silva

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

Catalogação na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE – Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia F. dos Santos, CRB4-2005

S586c Silva, Roselia Odete Justino da.
Caracterização fenotípica de resistência antimicrobiana de *staphylococcus spp.* e termotolerantes isolados de queijos de coalho./ Roselia Odete Justino da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2018.
61 folhas: fig., tab.

Orientador: Erilane de Castro Lima Machado.
Coorientador: Michelle Rose de Oliveira Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2018.

1. Saúde Pública. 2. *Staphylococcus*. 3. Queijo. I. Machado, Erilane de Castro Lima (Orientadora). II. Silva, Michelle Rose de Oliveira (Coorientadora). III. Título.

664.02 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-092/2018**

ROSELIA ODETE JUSTINO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. E TERMOTOLERANTES ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de concentração: Saúde Humana e meio Ambiente.

Aprovado em: 13/06/2018.

BANCA EXAMINADORA

_____
Profº. Dr. Emerson Peter da silva Falcão
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Dr.ª Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profº. Dr.ª Silvana Gonçalves Brito de Arruda
Universidade Estadual de Campinas

Á Deus meu refúgio

Ao meu noivo Emanuel Fernando por todo amor, apoio, incentivo e paciência.

A minha mãe Odete e ao meu pai José (em memoria) pelo apoio incondicional de sempre

A Professora Erilane e Michelle pelo conhecimento passado e apoio.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelas bênçãos diárias, cuidado e proteção, sem seus cuidados nada seria.

Ao meu noivo, Emanuel Fernando, pelo amor, carinho, cuidado, paciência, motivação, apoio e por me incentivar a ser uma pessoa melhor todos os dias. Sei que sem seu incentivo e companheirismo essa jornada teria sido bem mais difícil.

A meus pais, José (em memória) e Odete, por me apoiarem sempre e por me ensinar que as conquistas na vida são frutos de muito trabalho e dedicação.

Às minha amigas/irmãs de graduação, Adriana, Iara, Jéssica e Patrícia, que mesmos não trilhando essa jornada de forma direta comigo, torceram, ouviram, apoiaram e vibraram a cada nova etapa. Vocês são responsáveis em parte pela pessoa que sou hoje.

Aos colegas de turma no mestrado, Sandrelli Meridiana, Vanessa Karla, Carlos Campos, Leandro Luiz, Marcela Albuquerque, Monique Paixão, Alysson Lopes, Leonildo Nogueira e Samuel Lima, por terem tornado esses dois anos mais leves, divertidos e cheio de recordações que com certeza levarei para vida toda.

Às minhas companheiras de laboratório, Dayse Melo, Dayane Melo, Cristiane Vasconcelos e Alcione Lima, por cada ensinamento trocado, cada risada nos dias mais improváveis, pelo companheirismo.

À minha orientadora, Professora Erilane Machado, por todo o carinho, paciência, compreensão e orientação dada a mim durante este trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. Michelle Oliveira, por cada minuto de sabedoria passado, cada palavra de conforto, apoio, compreensão, carinho e por me mostrar que cada coisa tem seu tempo de acontecer.

Aos professores do programa, pelo conhecimento transmitido, pelo apoio na caminhada, pelos ensinamentos diretos e indiretos, quanto a arte da docência, que contribuiu de forma ímpar para minha formação acadêmica e profissional.

A FACEPE, pelo apoio financeiro, através do fornecimento da bolsa de mestrado, que me capacitou a participar neste projeto.

A todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu profundo e sincero agradecimento.

Ninguém é suficientemente perfeito,
que não possa aprender com o outro e,
Ninguém é totalmente destituído de
valores que não possa ensinar algo ao seu
irmão.
Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

O queijo de coalho é um alimento tipicamente nordestino, que compõe o habito alimentar da população de uma maneira geral, sendo produzido em sua maioria com leite cru, em pequenas queijarias e sob condições higiênicas sanitárias insatisfatórias de forma a favorecer o risco de contaminação do produto. Objetivou-se com o presente estudo avaliar os isolados de *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes de queijo de coalho quanto a caracterização fenotípica de resistência antimicrobiana. Para a realização das análises foram adquiridas 10 amostras de queijo de coalho de diferentes cidades do estado de Pernambuco e de diferentes produtores, sendo 5 de queijos de coalho e 5 de queijos de coalho artesanal. As amostras foram submetidas as análises microbiológicas para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes. Após a caracterização fenotípica dos isolados, os microrganismos foram submetidos ao teste de susceptibilidade à antimicrobianos através da técnica de disco difusão, mediante uso de dez antimicrobianos comerciais. Nas análises microbiológicas, constatou-se que entre as amostras de queijos analisadas, 40% (tipo A) e 80% (tipo B) apresentaram contagens para *Staphylococcus* coagulase positivo e coliformes termotolerantes acima do limite regulamentar estabelecidos pela legislação brasileira, sendo impróprias ao consumo pela população. Quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos, foi possível observar que os isolados de *Staphylococcus aureus* e não *aureus* apresentaram perfil de resistência e de multirresistência uma vez que mostraram resistência a até 5 agentes antimicrobianos diferentes. Salienta-se a ocorrência de *S. aureus* com resistência a meticilina (MRSA). Por outro lado. Os coliformes termotolerantes isolados ao serem submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana utilizando discos de ceftazidima e cefotaxina não expressaram resultados para o perfil ESBL. Pode-se concluir que há estirpes/cepas de *S. aureus* e não *aureus* com perfil de resistência e de multirresistência contaminando queijos de coalho do tipo A e tipo B comercializados em diferentes cidades de Pernambuco, pondo em risco a saúde da população, uma vez esse queijo é amplamente consumido.

Palavras chave: Contaminação microbiológica. Doenças veiculadas por alimentos. Saúde pública.

ABSTRACT

The rennet cheese is a typically Northeastern food, which makes up the general population's food habit, being mostly produced with raw milk, small dairies and under unsatisfactory sanitary hygienic conditions in order to favor the risk of product contamination. The objective of this study was to evaluate the isolates of Staphylococcus spp. and thermotolerant coliforms of rennet cheese for the phenotypic characterization of antimicrobial resistance. Ten samples of rennet cheese from different cities in the state of Pernambuco and from different producers were obtained for the analysis of the samples. Five samples of rennet cheeses and five of rennet cheeses were obtained. The samples were submitted to microbiological analysis for Coagulase positive Staphylococcus counts and thermotolerant coliforms. After the phenotypic characterization of the isolates, the microorganisms were submitted to the antimicrobial susceptibility test by the disc diffusion technique, using ten commercial antimicrobials. In the microbiological analysis, 40% (type A) and 80% (type B) were found to have positive coagulase Staphylococcus and thermotolerant coliforms above the regulatory limit established by Brazilian legislation, being unfit for consumption by the population. Regarding susceptibility to antimicrobials, it was possible to observe that Staphylococcus aureus and non-aureus isolates presented resistance and multiresistance profiles as they showed resistance to up to 5 different antimicrobial agents. The occurrence of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) is noted. On the other hand. The thermotolerant coliforms isolated when submitted to the antimicrobial susceptibility test using ceftazidime and cefotaxin disks did not express results for the ESBL profile. It can be concluded that there are strains / strains of S. aureus and no aureus with resistance and multiresistance profile contaminating type A and type B rennet cheeses marketed in different cities of Pernambuco, endangering the health of the population once this cheese is widely consumed.

Key words: Microbiological contamination. Foodborne diseases. Public health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Série histórica de surtos e casos de DVA´s no período d 2011 a 2015 no Brasil	22
Figura 1.2	Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DVA’s no Brasil de 2000 a 2015	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo das amostras de queijo coalho e queijo de coalho artesanal comercializado em cidades de Pernambuco.	35
Tabela 2.2	Contagem de coliformes termotolerantes das amostras de queijo coalho e queijo de coalho artesanal comercializado em cidades do estado de Pernambuco.	38
Tabela 2.3	Percentual de resistência antimicrobiana dos isoladas de *S. aureus* de queijo coalho e queijos de coalhos artesanais, comercializados em cidades de Pernambuco.	41
Tabela 2.4	Percentual de resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidas de queijo de coalho e queijo de coalho artesanal, comercializados em cidades de Pernambuco.	42
Tabela 2.5	Índice de Múltipla Resistência (MAR) correspondente às cepas de *S. aureus e Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijos de coalho e queijo de coalho artesanal comercializados em cidades de Pernambuco	44

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABIQ	Associação brasileira das industrias de queijo
AN	Ágar nutrient
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BPF	Boas práticas de fabricação
BHI	Brain heart infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cMLS	Resistência constitutiva à macrolídeos, licosaminas e estreptograminas
DVA	Doenças veiculadas por alimentos
EC	*Escherichia coli*
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuaria
EMB	Eozina azul de metileno
ESBL	Betalactamases de espectro estendido
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IN	Instrução normative
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
MAR	Múltipla resistência aos antimicrobianos
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
MS	Resistência à macrolideos e estreptograminas
OMS	Organização mundial da saúde
OPAS	Organização pan-americana de saúde

RDC	Resolução da diretoria colegiada
RTIQ	Regulamento técnico de identidade e qualidade
SEA	Enterotoxina A
SED	Enterotoxina D
SVS	Vigilância em saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
USDA	United States Department of Agriculture
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **13**

1.2 OBJETVOS 15

1.2.1 Objetivo geral **15**

1.2.2 Objetivo específicos **15**

1.3 REVISÃO DE LITERATURA 16

1.3.1 Histórico de produção de queijo **16**

1.3.2 Produção mundial de queijo **16**

1.3.3 Produção nacional de queijo **17**

1.3.4 O queijo de coalho no nordeste **18**

1.3.5 Doenças veiculadas por alimentos (DVA´s): Intoxicação alimentar X Infecção alimentar **20**

1.3.6 Microrganismos relacionados à contaminação de alimentos **23**

1.3.7 Bactérias resistentes a antimicrobianos **25**

2 CONTAMINANTES DE QUEIJOS DE COALHO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MULTIRRESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS **28**

3 CONCLUSÕES FINAIS **52**

REFERÊNCIAS **53**

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO **57**

1 INTRODUÇÃO

O Queijo de Coalho é um produto típico da Região Nordeste do Brasil sendo considerado forte representante cultural. É um componente presente diariamente na alimentação da população e fonte de renda familiar para os pequenos produtores e comerciantes. Devido as suas características físico químicas é um produto altamente perecível e de fácil contaminação, esse problema ainda se agrava quando associada a microrganismos com fenótipo de resistência, condição cada vez mais frequente. Sua produção se destaca pelo volume de produção e pelo amplo comércio, sendo a maior parte realizada nos estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba (ALMEIDA; PAIVA JÚNIOR; GUERRA, 2013).

A fabricação do queijo de coalho ainda mantém características tradicionais, rudimentares e regionais, quando produzidos em pequena escala. O queijo de coalho pode ser produzido a partir do leite pasteurizado, porém muitos são produzidos a partir de leite cru principalmente os que são fabricados em pequenas queijarias e comercializados de maneira informal (BRASIL, 2001a; 2001b).

De acordo com dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, o Brasil é o segundo maior produtor de queijo em toneladas, perdendo apenas para os Estados Unidos da América. No Estado de Pernambuco, classifica-se como queijo de coalho tipo “A” aquele produzido com leite pasteurizado e tipo “B”, o que é produzido com leite cru (PERNAMBUCO, 1999). Queijos artesanais como o de coalho, em sua maioria são produzidos em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação (BPF), devido a isto é um produto que não apresenta garantia de segurança microbiológica e padrão da qualidade, podendo oferecer risco ao consumidor (EMBRAPA, 2012).

A contaminação microbiológica além de proporcionar a deterioração do alimento, o torna um risco para a saúde da população. De acordo com o Ministério da Saúde, do ano de 2000 a 2015 foram notificados 11.241 surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), afetando 2.121.210 pessoas, resultando em 218.507 doentes e mais de 158 óbitos no Brasil (BRASIL, 2016).

Alguns microrganismos quando presentes nos alimentos podem ser indicativos de contaminação microbiológica, e isto pode acontecer devido à manipulação, processamento e armazenamento inadequados, oferecendo risco a quem consumi-los. Entre os agentes indicadores que traduzem crescentes preocupações em relação à contaminação de alimentos estão os grupos *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes, salientando-se que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* encontram-se envolvidos na maioria dos casos de surtos de DVA's (SILVA *et al.* 2010; SILVA, *et al.*, 2017).

A contaminação de alimentos por microrganismos patógenos traz outra preocupação, o aumento do número de casos de bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos. A presença de microrganismos importantes como *E. coli*, *S. aureus e Staphylococcus* não *aureus* apresentando perfil de resistência a vários antimicrobianos em produtos de origem animal representa um grande problema e ameaça para a saúde pública (GUIMARÃES *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2013; TOZZO *et al.*, 2015).

Os alimentos de origem animal contribuem de forma direta para a disseminação de cepas resistentes aos agentes microbianos, visto que na produção animal, são utilizados muitos antimicrobianos para controle de peso e infecções. Os antimicrobianos exercem pressão seletiva sobre os microrganismos podendo levar o desenvolvimento de fenótipo de resistência (GUIMARÃES *et al.*, 2012; CARDOSO; MARIN, 2014).

A resistência antimicrobiana é um problema global complexo, multifatorial e urgente uma vez que vem alcançando proporções cada vez maiores, isto tem trazido à tona o aumento da preocupação com as chamadas "superbactérias" sendo responsaveis por infecções graves de pouca resposta as terapias farmacologicas, pois possuem a capacidade de resistir a uma gama significativa de antimicrobianos presentes no mercado (LAMMIE; HUGHES, 2016).

A realização de estudos que contribuam com a identificação de bactérias com perfil de resistência e multirresistência torna-se de extrema importância, visto que é crescente o aparecimento de cepas com essas características fenotípicas em alimentos, incluindo o queijo de coalho. Desta forma, o presente estudo pode fornecer dados importantes para auxiliar em medidas de controle de produção e comercialização de alimentos pelos órgãos reguladores competentes, considerando a exposição da população a danos na saúde.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Isolar *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes em amostras de queijo de coalho e avaliar seu perfil fenotípico de resistência.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* spp. em amostras de queijo de coalho.
- Verificar a qualidade microbiológica dos queijos de coalho tipo A e B quanto à contagem de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positivo;
- Identificar *Escherichia coli, Enterobacter spp*., *Staphylococcus aureus e* não *aureus* de espécimes/cepas isolados de queijos de coalho;
- Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados dos queijos de coalho e queijo de coalho artesanal*;*
- Investigar a ocorrência de bactérias com perfil de multirresistência entre os isolados com fenótipo de resistência antimicrobiana dos queijos de coalho e queijo de coalho artesanal.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Histórico da produção de queijo

A história do queijo remonta ao berço da civilização antiga, sendo um dos alimentos mais antigos que se têm registros (6000-7000a.C.). Estudos arqueológicos revelaram que provavelmente a descoberta deste alimento tenha acontecido por acaso, uma vez que na época era comum o transporte do leite em sacos de couros de animais, por serem considerados um meio adequado para armazenamento de líquidos (CHALITA *et al.*, 2009).

Com o passar dos anos e a evolução de produtos e serviços o processo de fabricação de queijos passou por várias modificações e melhorias visando atender as variações da demanda social e aos paladares mais diversos e exigentes. Variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação contribuíram para a criação uma imensa variedade de queijos.

1.3.2 Produção mundial de queijo

O queijo é um alimento que apresenta sua produção e consumo difundido pelo mundo, cada região possui suas próprias características, sabores e peculiaridades. Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) a produção mundial de queijo em 2010 foi de 14,7 milhões de toneladas, onde destes a União Europeia foi responsável por 47,2% dessa produção, estando dessa forma junto aos Estados Unidos entre os maiores produtores mundiais de queijo (USDA, 2011).

Em âmbito mundial, a produção de leite foi crescente expressando uma taxa de crescimento de 9,4% no período de 2004 (401,4 milhões de toneladas métricas) a 2010 (439,5 milhões de toneladas métricas), aumento este relacionado aos aumentos na produção do sul da Ásia e da América do Sul. O incremento na produção mundial no período 2004 a 2010 também permitiu um maior consumo de

produtos lácteos no mundo; não para o leite fluido somente, pelo contrário, esse produto apresentou uma das menores taxas de crescimento com 7,3%, mas principalmente para subprodutos, como foi o caso do queijo e a manteiga que apresentaram crescimento de 11,4% e 26,3%, respectivamente (USDA, 2011).

O Brasil vem ampliando sua participação no comércio mundial, principalmente na última década, com maior competitividade de vários setores produtivos. Foi possível observar um aumento de 56% na participação das exportações brasileiras nas exportações mundiais, no período de 2000 a 2010 (BRASIL, 2010).

Dentre os principais produtos de exportação estão os provenientes do agronegócio, como por exemplo, o leite e seus derivados. Isso está atrelado diretamente às mudanças estruturais que ocorreram no setor, como por exemplo, investimentos em pesquisa, alimentação do rebanho, melhoramento genético, informática e qualidade da matéria-prima. Estes produtos foram à ignição para possibilitar o aumento da produção e consequente ampliação do mercado de exportações (IBGE, 2015).

1.3.3 Produção nacional de queijo

A produção de queijo tem grande importância no âmbito econômico nacional, sendo o Brasil o sexto maior produtor mundial de queijo. O queijo artesanal produzido com leite cru é um dos produtos mais tradicionais, herança da colonização portuguesa introduzida no Brasil no século XVIII. Sem perder a tradição, os produtores avançam na modernização para atender às exigências de segurança alimentar e agregar valor ao produto (SEBRAE, 2016).

O crescimento da produção de queijos no Brasil apresentou uma diminuição em 2015, depois de aumentar as taxas entre 8% e 9% em anos anteriores. O avanço foi bem mais modesto, de 2,9% sobre 2014 e alcançou 1,105 milhão de toneladas, segundo estimativas da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. O número se refere aos queijos produzidos por empresas com Serviço de Inspeção Federal (SIF). A desaceleração tem duas razões, de acordo com a entidade: a escassez de leite no Brasil em 2015 e a queda no consumo no segundo semestre de

2014 em decorrência dos efeitos da crise econômica na renda da população brasileira (ABIQ, 2015).

Quando comparado o consumo brasileiro de queijos com outros países da América do Sul pode-se identificar uma demanda maior nesses demais países, enquanto no Brasil, foram consumidos 5,4 quilos *per capta* em 2015, em países como Chile e Argentina a demanda por habitante supera os 10 quilos (IBGE, 2015).

O Brasil possui uma rica produção e variedade de queijos de diversos tipos entre eles o queijo coalho, que devido a suas características peculiares apresenta grande aceitação comercial. Seu sabor e consistência faz com que esteja entre os principais tipos de queijos nacionais produzido e consumido principalmente nos estados do Nordeste como Ceará, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, cujas características físico-química e sabor característicos os colocam como um dos principais queijos nacionais produzidos (SEBRAE, 2008a; ALMEIDA; PAIVA JÚNIOR; DANTAS, 2012; GUERRA, 2013).

1.3.4 O queijo de coalho no Nordeste

O queijo de coalho por ser um produto cultural do Nordeste, torna-se um dos queijos mais produzidos e consumidos na região, em parte por conta do seu processo de fabricação ser relativamente simples e por seu sabor característico, elevando sua expansão comercial de maneira significativa (DANTAS, 2012).

O queijo de coalho é um produto bastante consumido por todas as faixas etárias e condições socioeconômicas na região Nordeste do Brasil, e sua produção representa uma atividade bastante significativa e influencia diretamente a economia da região, determinando assim uma fonte de renda na população nordestina (PERRY 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010).

A produção do queijo de coalho em Pernambuco possui fundamental importância na economia principalmente dos pequenos municípios de bacia leiteira do Estado, onde constituem a principal fonte de renda familiar da região e também dos fornecedores de leite (SILVA *et al.*, 2012).

Por ser um produto artesanal mantém características tradicionais, rudimentares e regionais no seu processo de produção, são produzidos em pequena escala, devendo obedecer aos parâmetros fixados em regulamentos, porém, na prática ficam à margem da legislação vigente, sem controles de qualidade sendo comercializada, na maioria das vezes informalmente. O seu comércio é bastante difundido, sendo encontrado nos mais diversos pontos de venda: porta a porta, feira livre, lojas de produtos nordestinos, mercadinhos, supermercados, entre outros, sendo adquirido por várias faixas de renda, e consumido em quantidade e formas variadas: cru, assado, frito ou cozido (DANTAS, 2012).

No entanto a sua imagem ainda é muito relacionada com um alimento que não apresenta segurança microbiológica satisfatória, por problemas atrelados à matéria-prima e por não apresentar conformidades no processo de fabricação, armazenamento e transporte, e esta exposição do queijo de coalho predispõe este produto à contaminação e um risco potencial como transmissor de Doenças Veiculadas por Alimentos (OPAS; OMS, 2009; DANTAS, 2012).

Salienta-se que apesar da proibição legal da Portaria nº 146 (BRASIL, 1996) imposta à comercialização de queijos elaborados a partir do leite cru sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as boas práticas de fabricação (BPA´s), o comércio tem sido realizado abertamente em todo o Nordeste sem apresentar padronização da qualidade ou segurança microbiológica.

Dantas (2012) reforça que a produção do queijo não atende as normas de higienização e sanitização vigentes uma vez que a maior parte da produção de queijo de coalho (85%) é realizada com leite cru apesar de ser apresentado no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de queijo de coalho, que o leite deve ser submetido a processos mecânicos apropriados e tratamento térmico como pasteurização.

Em Pernambuco, isto pode ser justificado pela Resolução nº 2 de 19 de abril de 1999 da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária do estado de Pernambuco (PERNAMBUCO, 1999), que estabelece a identidade do queijo de coalho como “Produto artesanal ou não, no qual o queijo fresco é obtido do leite cru

ou pasteurizado, integral ou desnatado, dessorado, maturado ou não, produzido em queijaria artesanal".

O queijo de coalho de produção artesanal ou não, classifica-se em tipo A por ser elaborado com leite pasteurizado, integral ou desnatado, de massa crua prensada, maturado; e como tipo B por ser produzido com leite cru, integral ou desnatado, e de massa crua prensada ou não, e maturado (PERNAMBUCO, 1999).

Vale salientar que além do uso de matéria-prima de baixa qualidade, como leite cru ou mal pasteurizado, a contaminação microbiológica de produtos derivados do leite pode ter várias origens como falhas após pasteurização do leite; equipamentos inadequados e/ou falha na higienização; contaminação cruzada com outros produtos; contaminação no armazenamento; contaminação nos locais de comercialização, entre outros, e isso tudo reflete diretamente na ausência da adoção das BPFs.

1.3.5 Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's): Intoxicação alimentar X Infecção alimentar

Doenças veiculadas por alimentos (DVA's) é um termo genérico relacionado a uma síndrome que resulta em diferentes sintomas como anorexia, vômito, náuseas e/ou diarreia. As DVA's são resultados da ingestão de alimentos e/ou água contaminada por toxinas, agrotóxicos, bactérias, vírus, príons, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2011).

A multiplicidade de agentes causais e as suas associações a alguns dos fatores citados resultam em um número significativo de possibilidades para a ocorrência das DVA's como infecções ou intoxicações que podem se apresentar de forma crônica ou aguda, com características de surto ou de casos isolados, com distribuição localizada ou disseminada e com formas clínicas diversas (FOOD SAFETY BRAZIL, 2016).

As doenças de origem alimentar podem englobar duas grandes categorias: intoxicações alimentares e infecções alimentares. Intoxicações alimentares são causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, produzidas durante a proliferação de microrganismos patogênicos nos alimentos. Já

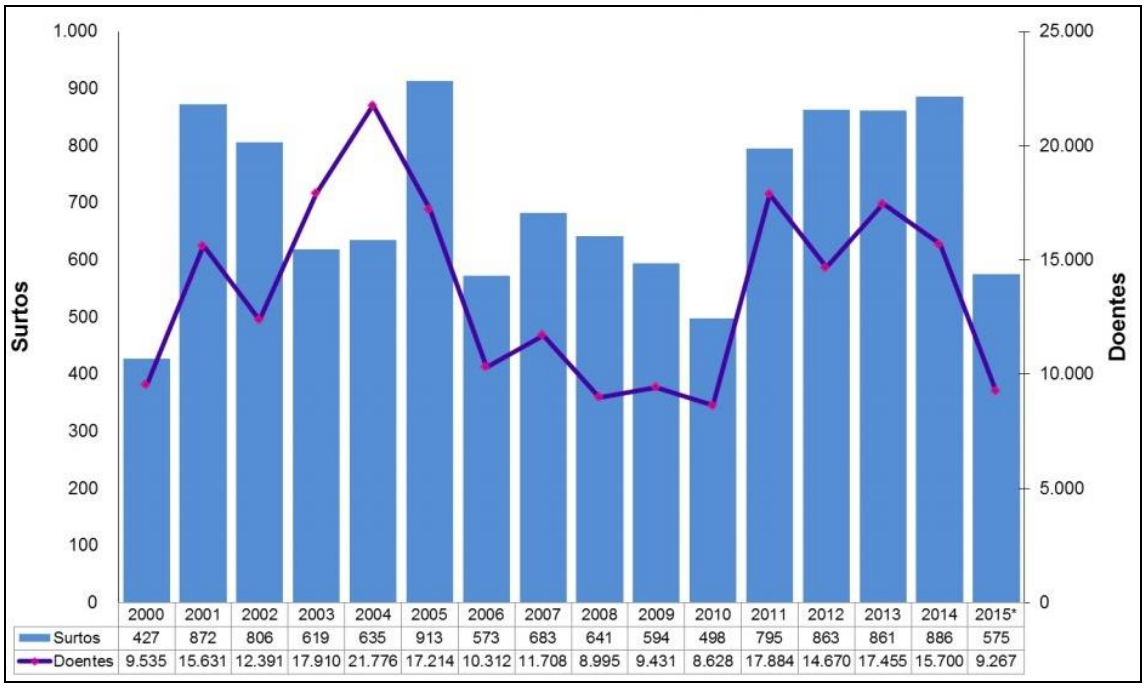
as infecções alimentares causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos, que aderem à mucosa do intestino humano e se prolifera, colonizando-o, e a seguir, podem ocorrer invasão da mucosa e penetração nos tecidos onde causam lesões ou ainda a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrintestinal (RUWER *et al.*, 2011).

A saúde do consumidor está diretamente relacionada à qualidade dos produtos consumidos pelos mesmos. Infecções e intoxicações alimentares são problemas sérios de saúde pública devido ao número crescente de casos e sua gravidade, bem como pela diversidade de microrganismos patogênicos envolvidos. O controle de qualidade na indústria alimentícia é de extrema importância, uma vez que não se trata apenas de oferecer um produto que apresente qualidade microbiologica, mas também de contribuir para a saúde e bem estar do consumidor (MONTEIRO, 2015).

A multiplicação e produção de enterotoxina de *S. aureus,* por exemplo, ocorre após a exposição de alimentos a temperaturas acima de 10 °C. Atualmente, cerca de 20 tipos de enterotoxinas estafilocócicas são identificadas, sendo enterotoxinas A (SEA) e enterotoxinas D (SED) as mais frequentes associadas com intoxicação alimentar por *Staphylococcus*. O crescimento de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* na proporção de 10^6 ou mais por células por grama de alimento é geralmente considerado necessário para a produção de uma quantidade suficiente de enterotoxina capaz de causar intoxicação se o alimento for consumido (TONDO *et al.*, 2013).

Entre os anos de 2011 a 2015 no Brasil, verifica-se uma variação no número de casos de DVA's e surtos alimentares (Figura 1.1). Assim, é possível observar que a partir de 2011 os casos tiveram uma tendência de declínio, isso pode estar associado ao aumento da fiscalização sanitária, implementação de boas práticas de fabricação e melhoria da higiene, transporte e armazenamento das matérias-primas e produto final.

Figura 1.1: Série histórica de surtos e casos de DVA no período de 2011 a 2015 no Brasil.



	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015*
Surtos	427	872	806	619	635	913	573	683	641	594	498	795	863	861	886	575
Doentes	9.535	15.631	12.391	17.910	21.776	17.214	10.312	11.708	8.995	9.431	8.628	17.884	14.670	17.455	15.700	9.267

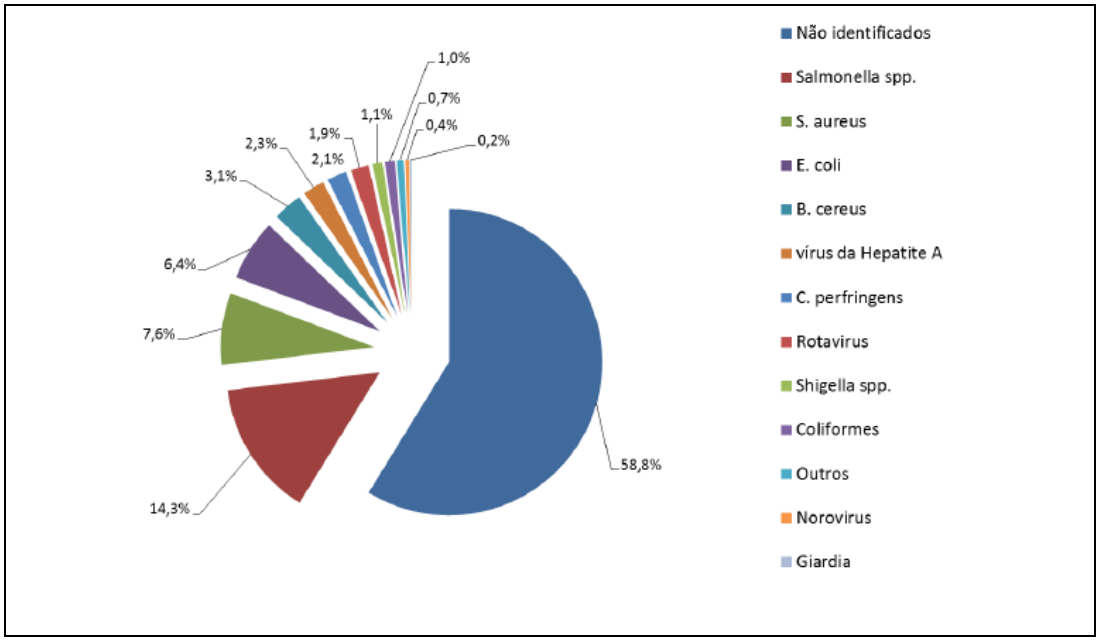
Fonte: (BRASIL, 2016).

1.3.6 Microrganismos relacionados à contaminação de alimentos

O leque de patógenos que podem ser transmitidos por água/alimentos é bastante amplo. São conhecidos cerca de 250 agentes etiológicos relacionados a DVA's, podendo causar além das disenterias, quadros mais complexos. Existem várias formas conhecidas de contaminação dos alimentos por agentes biológicos patogênicos, no caso da fabricação do queijo de coalho está diretamente relacionada com a falta de condições higiênico sanitárias adequada e boas práticas de fabricação (BARRETO *et al.*, 2016).

Dados do ministério da saúde do Brasil destacam os principais agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DVA's no país entre os anos de 2000 a 2015, onde é possível observar que a maioria os surtos identificados são causados por *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli* figura 1.2.

Figura 1.2: Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DVA no Brasil de 2000 a 2015.



Fonte: (BRASIL, 2016).

A contaminação de alimentos está relacionada diretamente ao manejo e ao acondicionamento do produto, seja no local de produção ou no de comercialização e pode ocorrer de diversas maneiras, seja na forma física, química ou microbiológica, isoladas ou em conjunto. As condições higiênico-sanitárias inadequadas da matéria-prima, falhas no processamento, armazenamento, transporte e exposição do produto a contaminação durante a comercialização, trazem como consequências, queijos de baixa qualidade expondo o consumidor ao risco de DVA (DANTAS, 2012).

A ingestão de queijos contaminados pode trazer consequências para a saúde da população, tornando-se, portanto um problema de saúde pública. Para detectar possíveis contaminações nos alimentos utilizam-se grupos de microrganismos indicadores (coliformes). Quando esses microrganismos indicadores estão presentes em alimentos evidenciam a ocorrência de contaminações de origem fecal. Os indicadores mais comuns são os coliformes totais e coliformes fecais, também conhecidos como coliformes termotolerantes (PINTO *et al.*, 2009).

Escherichia coli é um dos representantes do grupo de coliformes termotolerantes, sendo um microrganismo comensal, presente no intestino de mamíferos e aves (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Conforme descrito por Vasconcelos *et al.* (2010), *Escherichia coli* é o principal agente etiológico de infecções entéricas

causadas pela água e alimentos contaminados. Em virtude da complexidade dos mecanismos de resistência, a seleção de fármacos apropriados para a terapia antimicrobiana, torna-se uma missão cada vez mais difícil, podendo levar ao aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes tratados incorretamente.

Em outro estudo realizado por Guimarrães *et al.* (2012) foi possivel observar que cepas de *E. coli* encontradas em queijos de coalhos comercializados na orla de Salvador -BA apresentaram-se resistente a um ou mais grupos de antimicrobianos, totalizando 27,78% das amostras avaliadas. Isto torna ainda mais evidente o potencial e a complexidade do mecanismo de resistência desses microrganismos.

Outro microrganismo comumente associado a surtos alimentares é *Staphylococcus* spp. Essas bactérias são frequentemente encontradas em diversas superfícies ambientais e principalmente na superfície corporal dos mamíferos, estando presentes na superfície nasal, cabelos, garganta e pele. No Brasil, *S. aureus* foi identificado como o segundo mais importante patógeno de origem alimentar durante o período de 1999 a 2011, sendo responsável por 41% dos surtos de origem alimentar investigados (TONDO *et al.*, 2013).

Devido à variedade de mecanismos de virulência conhecidos, *S. aureus* é considerado um dos mais versáteis microrganismos, podendo causar doenças através da sua capacidade de multiplicação e ampla disseminação pelos tecidos, bem como pela produção de enterotoxinas, estas são resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização (BORGES *et al.*, 2008).

A Vigilância Epidemiológica do estado da Paraíba entre os períodos de 2004 e 2008 verificou-se 42 casos de surtos alimentares, envolvendo 481 enfermos do total de 1266 pessoas expostas ao risco. Destes surtos 23,8% estavam associados a queijos, acometendo 59 pessoas (12,26%) e expondo ao risco 184 pessoas (14,53%). Dos 10 episódios de surtos alimentares associando queijos, 90% aconteceram no interior de João Pessoa por haver um maior consumo deste derivado lácteo e 10% na capital (OPAS, 2009).

Diante deste cenário, o Ministério da Saúde através do Regulamento da Diretoria Colegiada (RDC 12 de 02/01/2001) da ANVISA (BRASIL, 2001), estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, e para os alimentos de média a alta umidade, onde o queijo de coalho pode ser enquadrado, é considerado como limite de tolerância quando em 25g do produto apresentar valores de 5×10^2 UFC/g, isto para *Staphylococcus* coagulase positiva.

Em estudo realizado com 104 amostras de queijo de coalho comercializadas em seis estados do Nordeste do Brasil (Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), envolvendo 54 amostras não inspecionadas e 50 amostras inspecionadas, foi possível verificar que todos os queijos analisados apresentavam-se fora das normas microbiológicas exigidas pela legislação vigente. Estes dados demonstram que o consumo de queijo de coalho torna-se impróprio para os consumidores deste produto, podendo desencadear graves riscos à saúde humana (SOUSA *et al.*, 2014).

1.3.7 Bactérias resistentes a antimicrobianos

O problema de bactérias resistentes e multirresistentes à antimicrobianos é cada vez mais crescente, evidenciando um problema sério de saúde pública. *S. aureus* foi uma das primeiras bactérias a serem controladas com a descoberta dos antimicrobianos, mas devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS *et al.*, 2007).

A advertência da imprensa popular sobre bactérias multirresistentes, as "superbactérias" em alimentos levantam questões sobre a segurança do abastecimento alimentar global. Vários estudos têm demonstrado uma ligação entre o uso de antimicrobianos na pecuária e aumento da prevalência de bactérias com resistência a estes agentes (WITTE, 2000; MCEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002).

Os antimicrobianos utilizados na ração animal, tratamentos clínicos recorrentes e automedicação têm elevado o aparecimento de cepas bacterianas com perfil de resistência e multirresistência. A resistência antimicrobiana acontece

quando os microrganismos conseguem manter seu crescimento mesmo quando expostos à antimicrobianos, isto se dá através de mudanças funcionais e características estruturais do próprio microrganismos como resposta da pressão seletiva sofrida (BORGES *et al.*, 2016).

A resistência aos antimicrobianos pode acontecer devido a uma característica constitutiva de determinadas espécies de bactérias, fazendo com que essa estirpe resista a um dado antibiótico como resposta dessa característica estrutural ou funcional presente na espécie (BLAIR *et al.*, 2015); Pode ser um mecanismo adquirido como resultado do processo de mutação sofrido durante a replicação celular ou por mecanismos de indução através de agentes mutagênicos (BAPTISTA, 2013); Ou pode ser adquirida através da aquisição de material genético exógeno presente em outros microrganismo contendo genes de resistência, sendo propagados através do mecanismo de transferência de gene (MATTEWS *et al.*, 2007; COSTA, 2016; MORAES; ARAÚJO; BRAGA, 2016).

Segundo Doyle (2015), os seres humanos podem ser potencialmente expostos a agentes patogênicos multirresistentes através de uma variedade de vias incluindo o ambiente a que estão expostas, solo e água contaminados, produtos animais, entre outros, essa resistência aos fármacos acarreta para a saúde pública um grande aumento nos gastos com a população, uma vez que pacientes que apresentam infecções com bacterias multiresistentes exigem um cuidado maior e urgente.

Desta forma, bactérias multirresistentes a fármacos podem ser consideradas uma ameaça em potencial à saúde humana uma vez que infecções causadas pelas mesmas apresentam altas taxas de morbimortalidade e requerem maior tempo de internação e tratamento, assim como altos custos para serem debeladas. A contaminação alimentar associada a cepas que apresentam fenótipos de reistência/multirresistência caracterizam um problema de saúde publica cada vez mais evidente. O consumo de alimentos contaminados expõe a população a serios riscos, uma vez que a terapia farmacologica é reduzida devido a capacidade de adaptação desses microrganismos (GUIMARÃES *et al.*, 2012)..

Sendo assim se fazem necessarios estudos que viabilizem a identificação desses patogenos a fim de fornecer dados aos órgão cabíveis para que as medidas pertinentes a segurança alimentar e nutricional, bem como medidas decontrole e

fiscalização, possam ser tomadas, influenciando diretamente na redução de números de casos de surtos alimentares envolvendo cepas resistentes ou multirresistentes.

2 ARTIGO

COALHO CHEESE CONTAMINANTS: PHENOTYPIC DESCRIPTION AND ANTIMICROBIAL MULTIRESISTANCE

CONTAMINANTES DE QUEIJOS DE COALHO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MULTIRRESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS

Artigo original submetido á revista Alimentação humana.

Contaminantes de queijos de coalho: Caracterização fenotípica e multirresistência à antimicrobianos

SILVA, R.O.J[1]; MACHADO, E.C.L[1]; SILVA, M.R.O[1]; BORGES FILHO, E.F.A[2];

1 **Universidade Feredal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória.**

2 **Secretaria de Educação de Pernambuco-SEDUC.**

2.1 Resumo: Objetivou-se com este trabalho avaliar cepas de *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes isoladas de queijos de coalho e de queijos de coalho artesanal quanto a caracterização fenotípica e resistência antimicrobiana. Amostras de queijos de coalho (5) e do produto artesanal (5) foram submetidas a análises microbiológicas, e isolados de *S. aureus*, *S.* coagulase negativa (SCN) e termotolerantes ao teste de susceptibilidade a dez antimicrobianos. Verificou-se contagens de *S.* coagulase positiva e coliformes termotolerantes acima dos limites permitidos em queijos de coalho (40%), e no produto artesanal (80%). Entre Staphylococcus, identificou-se resistência a penicilina,

eritromicina, clindamicina e cefoxitina, e além destes, resistência a gentamicina e tetraciclina apenas entre as cepas de *S. aureus* isolados do produto artesanal. SCN de ambos tipos de queijos apresentaram perfil de multirresistência, enquanto entre os isolados de *S. aureus* apenas do produto artesanal. Verificou-se cepas com resistência mínima a três classes de antimicrobianos e a até 4 ou 5 agentes antimicrobianos distintos, para SCN e *S. aureus*, respectivamente. Cepas de coliformes termotolerantes expressaram resistência a ampicilina, cefoxitina, sulfazotrin e imepenem, mas não o perfil ESBL (betalactamases de espectro estendido). Conclui-se que *S. aureus* e SCN com perfil de resistência e multirresistência a antimicrobianos ocorrem em queijos de coalho comercializados em cidades do Estado de Pernambuco.

Palavras chaves: Antimicrobianos, contaminação alimentar, leite.

2.2. Abstract: This work aimed to evaluate strains of *Staphylococcus* spp. and thermotolerant coliforms isolated from coalho cheeses and artisanal coalho cheeses for phenotypic characterization and antimicrobial resistance. Samples each type of cheese (5) were submitted to microbiological analysis and strains of *S. aureus*, negative coagulase S. (NCS) and thermotolerant were isolated from products and submitted to antimicrobial susceptibility tests with ten antimicrobials. It was verified counts of positive coagulase *S*. and thermotolerant coliforms above the permitted limits in coalho cheeses (40%), and in the artisanal product (80%). Among staphylococci, resistance to penicillin, erythromycin, clindamycin and cefoxitin were identified beside the resistance to gentamicin and tetracycline only among strains of *S. aureus* isolated from the artisanal product. NCS of both types of cheeses presented multidrug resistance profile, while among isolates of *S. aureus* only from the artisanal product. Strains with minimal resistance to three classes of antimicrobials and up to 4 or 5 distinct antimicrobial agents were found for NCS and *S. aureus*, respectively. Strains of Thermotolerant coliform expressed resistance to ampicillin, cefoxitin, sulfazothrin and imepenem but not the ESBL profile (extended spectrum beta-lactamases). It was concluded *S. aureus* and NCS with antimicrobial resistance and multidrug resistance profile occur in coalho cheeses commercialized in cities of the State of Pernambuco.

Keywords: Antimicrobial, food contamination, milk.

2.3 Introdução

O queijo de coalho é um produto tipicamente nordestino, apresentando grande produção e consumo nesta região. A maior parte dessa produção é realizada nos estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba[1,2,]. Em qual a produção de queijo de

coalho acontece de forma artesanal em pequenas queijarias, sendo realizada em grande parte com leite cru e sem as condições higiênicas sanitárias necessárias a fabricação de um alimento com qualidade e segurança microbiológica. “Em portaria Nº 007 de janeiro de 2018, a Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária do estado de Pernambuco- ADAGRO, classifica o queijo de coalho em “queijo de coalho artesanal” os produzidos a partir do leite cru e “queijo de coalho’’ os fabricados com leite pasteurizado[3]. A obtenção da matéria prima de qualidade e que apresente segurança microbiológica ao consumidor depende de boas práticas de higiene, produção e manipulação. Quando isto não ocorre à saúde do consumidor pode ser afetada diretamente, devido à contaminação do alimento por microrganismos patógenos[4].

A contaminação microbiana dos queijos artesanais é um grave problema de saúde pública, sendo considerado um dos principais veículos causadores doenças de origem alimentar, uma vez que sua maioria é produzida a partir de leite cru[5,6](RUTHES; GOULARTE, 2013; TOZZO et al., 2015). *Staphylococcus aureus* e algumas bactérias do grupo coliformes, tais como a *Escherichia coli* são comumente associados à contaminação alimentar e doenças veiculadas por alimentos (DVA’s). Tem se tornado crescente o número de cepas apresentando perfil de resistência e multirresistência isoladas de alimentos de origem animal como queijos[7,8,9].

Staphylococcus aureus foi uma das primeiras bactérias a serem associadas a infecções clinicas e é amplamente associada a surtos de doenças transmitidas por alimentos, porém não é o único. *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) também estão presentes em vários casos de surtos de infecções alimentares, incluindo cepas com perfil de resistência e multirresistência. *Staphylococcus* coagulase negativa até pouco tempo não estavam relacionados à contaminação de alimentos[10,4,11] .

A presença de bactérias patógenas como contaminantes de alimentos traz à tona outro problema enfrentado mundialmente, as bactérias com perfil de resistência, visto que está cada vez maior a presença desses patógenos em alimentos amplamente consumidos, principalmente os de origem animal. Isto evidencia um problema sério de saúde publica devido ao risco da exposição da população á esses microrganismos [12,13].

Os microrganismos em sua maioria possuem uma alta capacidade adaptativa o que permite o ajuste às condições mais adversas como forma de garantir sua sobrevivência e crescimento. Entre esses fenômenos adaptativos podemos destacar a resistência e a multirresistência aos antimicrobianos como sendo um dos problemas mais preocupantes[14]. A resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade do microrganismo de sobreviver à exposição de substâncias que em condições normais causariam a inibição de

seu crescimento e posterior morte. Esta capacidade adquirida ou inerente ao microrganismo tem se tornado um problema cada vez mais frequente de saúde pública, uma vez que afeta diretamente o controle de diversas enfermidades, causando uma limitação no tratamento e maiores gastos com a saúde por restringir a capacidade de atuação dos fármacos, aumentando assim o número de internações e mortalidade[15, 16,17].

Microrganismos com fenótipo de resistência a antimicrobianos que são encontrados e veiculados por alimentos podem apresentar a capacidade de transferir esses genes de resistência a outros microrganismos de outras espécies que povoem o trato gastrointestinal, e isto torna a contaminação alimentar por esses patógenos inda mais grave[18] .

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar e avaliar as cepas de *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes de queijos de coalho quanto a caracterização fenotípica de resistência antimicrobiana a fim de evidenciar a presença desses microrganismos em alimentos e ressaltar a necessidade de estudos a cerca do tema.

2.4 Metodologia

Obtenções das amostras de queijo coalho

Queijos de coalho são comercializados em hipermercados, mercados e/ou feiras livres de diferentes regiões e municípios, incluindo de Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil. Para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas 5 amostras de queijos de coalho (elaborado com leite pasteurizado) e 5 de queijo de coalho artesanal (elaborado com leite cru). De forma a obter uma maior abrangência da amostragem, os queijos foram de procedências distintas, quanto a cidade e produtor, sendo oriundos da Zona da Mata e Agreste de Pernambuco que fazem parte da bacia leiteira e produtora de queijo do Estado: Arcoverde, Bom conselho, Cachoeirinha, Camocim de São Félix, Panelas, São bento do Una e Venturosa,. As amostras coletadas foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo industrializado, tipo gel, e posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram mantidas sob refrigeração a temperatura de 6± 2ºC até o momento das análises.

Preparo das amostras de queijo coalho

Inicialmente as amostras foram pesadas em balança analítica para se obter 25 ± 0,2g conforme descrito na Instrução Normativa Nº 62/2003 do Ministério da Agricultura – MAPA[19]. Em seguida, foram colocadas em sacos esterilizados contendo 225 mL de água peptonada a 0,1% e homogeneizada a 36 batidas por minutos aproximadamente em homogeneizador tipo "*stomacher*" por aproximadamente 5 minutos para a obtenção da primeira diluição (10^{-1}) da amostra. A partir da diluição 10^{-1} foram preparadas diluições decimais sucessivas até 10^{6}.

Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi adotado o método de cultivo "*spread plate*" utilizando o Ágar Baird-Parker, conforme Instrução Normativa Nº 62 do MAPA[19] (BRASIL, 2003). A partir de cada diluição decimal, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio Ágar Baird-Parker acrescido de gema de ovo e telurito de potássio a 3,5%. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, as amostras foram espalhadas sobre as superfícies do meio para a obtenção do crescimento homogêneo. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C por 48 horas. Após este período, a contagem foi realizada em placas que continham entre 20 e 200 colônias, conforme recomendação da IN, sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônias por grama das amostras (UFC/g).

Isolamento e confirmação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus*

Para a confirmação de *Staphylococcus* coagulase positiva foram transferidas cinco colônias típicas e atípicas para tubos de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Os tubos foram incubados em estufa tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C por 24 horas e, após o período de incubação, foi realizada a prova da coagulase, que consiste em transferir 0,3 mL dos cultivos em BHI para tubos de ensaio esterilizados e adicionar 0,3 ml de plasma liofilizado de coelho. Após homogeneização do cultivo com o plasma, os tubos foram incubados em estufa tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C por 6 horas. A leitura da reação foi realizada de acordo com a classificação dos coágulos pela instrução normativa Nº62 do MAPA, conforme escala crescente: 1+, 2+, 3+ e 4+, sendo os coágulos de grau 4+ os de maior consistência. Foi considerado para os testes confirmatórios de *Staphylococcus aureus* quando a reação de coagulação foi do tipo 3+ e 4+.

As cepas que foram sugestivas para *S. aureus* foram submetidas a provas complementares, tais como a coloração de Gram e os testes de catalase, manitol e DNAse, conforme Instrução Normativa Nº 62/2003 do Ministério da Agricultura – MAPA.

Contagem de coliformes termotolerantes

Para a contagem de coliformes termotolerantes foi adotada a metodologia descrita pela IN nº 62 do MAPA[19]. A partir de cada diluição decimal, alíquotas de 1 mL foram inoculadas usando a técnica "*pour plate*" em ágar *Violet Red Bile Agar* (VRBA) e, em seguida, incubadas em estufa tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C por 24 horas. O resultado final foi determinado pela contagem de colônias nas placas que apresentarem entre 15 a 150 colônias, conforme recomendação da IN, e expressos em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g).

A confirmação de coliformes termotolerantes foi realizada a partir das colônias típicas e atípicas inoculadas e escolhidas em caldos seletivos, com o auxílio de uma alça de platina, foram repicadas em tubos de ensaio contendo caldo *Escherichia coli* (EC) incubados em banho-maria com agitação constante, regulada a temperatura de 45 ± 1°C por 48 horas. A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela formação de gás no interior dos tubos de Durham ou efervescência após agitação dos tubos.

Isolamento e confirmação de *Escherichia coli*

Para o isolamento e confirmação da presença de *E. coli* foi considerada a metodologia descrita por Kornacki e Johnson[20] . As culturas de cada tubo de ensaio com caldo EC considerados positivos foram semeadas em placas de Petri contendo o meio Ágar Eozina Azul de Metileno (EMB) e as placas foram incubadas em estufa tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C por 24 horas. As colônias que apresentaram brilho verde metálico foram consideradas sugestivas para *E. coli* e, então, selecionadas, repicadas em tubos de ensaio contendo AN, incubadas por 24 horas em estufa do tipo BOD a temperatura de 36 ± 1°C e, posteriormente, mantidas sob refrigeração para realização de provas bioquímicas complementares, tais como, fermentação de açucares, urease, motilidade, indol e produção de gás sulfídrico.

Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Os isolados de *Staphylococcus* spp. e coliformes termotolerantes foram submetidos ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão descrita por Bauer et al., 1966 conforme estabelecida pelo protocolo M02-A11 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*[21]. Após ativação das cepas em meio ágar nutriente, preparou-se o inoculo bacteriano contendo 10^8 UFC/ml que corresponde ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Com o auxílio do *swab* esterilizado, o inoculo foi semeado em placas de Petri contendo o Ágar Mueller–Hinton para posterior distribuição dos discos de antimicrobianos. A

fim de verificar o fenótipo de resistência principal para staphylococcus spp, *Staphylococcus* resistente a meticilina (MRS) e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) foram utilizados discos de cefoxitina 30 µg, enquanto para o fenótipo de resistência a macrolideos, licosaminas e estreptograminas constitutiva (cMLS) foram utilizados discos de eritromicina15 µg e clindamicina 15 µg . Outros antimicrobianos de importância clinica também foram utilizados para compor o teste de susceptibilidade, tais como: Ciprofloxacino 5 µg, Gentamicina 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Amicacina 30 µg, Penicilina G 10 µg, Cloranfenicol 30 µg, Sulfazotrim 25 µg.

Considerando o fenótipo principal de resistência para enterobactérias, para o teste preliminar para betalactamases de espectro estendido (ESBL) foram utilizados discos de ceftazidina 30 µg e cefotaxina 30 µg, conforme sugerido pelo CLSI. Contudo, os seguintes antimicrobianos de importância clinica também foram utilizados para o teste de susceptibilidade: Ampicilina 10 µg, Gentamicina 10 µg, Imipenem 10 µg, Cloranfenicol 30 µg, Tetraciclina 30 µg, Sulfazotrim 25 µg, Norfloxacina 10 µg e Aztreonam 30 µg. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a temperatura de ±37°C por 24 horas. A leitura dos resultados do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada medindo-se os tamanhos dos halos de inibição com um paquímetro e expressos em milímetros, sendo classificados como resistente, intermediário ou sensível de acordo com a tabela de referência estabelecida pelo CLSI para cada antimicrobiano.

Determinação de multirresistência antimicrobiana

O resultado de multirresistência foi determinado através do Índice de Múltipla Resistência a Antimicrobianos (MAR), com base na relação a/b, onde (a) refere-se ao número de antimicrobianos aos quais os isolados foram resistentes e (b) ao número total de antimicrobianos ao qual o isolado foi exposto. Os valores encontrados de 0,1 a 0,5 correspondem a resistente da cepa a um ou a até cinco agentes antimicrobianos distintos a que a cepa foi resistente, respetivamente[22].

Determinou-se ainda a multirresistência a partir do cálculo da resistência mínima a três classes de antimicrobianos, considerando o número de antimicrobianos de diferentes classes a que os isolados apresentaram resistência conforme descrito por Magiorakos *et al.*[23]. Desta forma, o microrganismo é considerado multirresistente quando apresentar resistência a pelo menos três classes distintas de antimicrobianos.

2.5 Resultados e Discussão

Análise microbiológica

Em relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nos queijos de coalho e queijos de coalho artesanal, os resultados estão apresentados na tabela 2.1. Verificou-se que entre as amostras de queijo de coalho, 40% (2/5) apresentaram contagens acima do limite máximo permitido de 5 x 10^2 UFC/g segundo a Resolução Nº 12 da ANVISA[24], enquanto entre as do queijo de coalho artesanal, 80% (4/5) encontraram-se acima do limite máximo permitido pela legislação. Desta forma, verificou-se que o maior percentual de contaminação ocorreu nos queijos produzidos a partir do leite cru quando comparados ao que foram produzidos a partir do leite pasteurizado, evidenciando que a contaminação pode ter sido favorecida pela falta de condições higiênico sanitárias adequadas.

Tabela 2.1. Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo das amostras de queijo coalho e queijo de coalho artesanal comercializado em cidades de Pernambuco.

Amostras de queijo coalho	Análises *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g)				
Queijos de coalho	A1	A2	A3	A4	A5
	< 10	1,37 x 10^6	<10	<10	1,3 x 10^3
Queijos de coalho artesanal	B1	B2	B3	B4	B5
	2,18 x 10^5	<10	8,6 x 10^4	2,6 x 10^4	3,8 x 10^4

Notas: <10 UFC/g representa ausência de crescimento microbiano, levando-se em conta os limites de detecção dos métodos utilizados.

O leite como matéria prima para a produção do queijo de coalho e outros derivados precisa apresentar qualidade microbiológica satisfatória uma vez que influencia diretamente no padrão de qualidade do produto final. Falhas no processo de ordenha, manuseio, fabricação armazenamento e transporte podem ser relacionados diretamente a contaminação do produto[4].

O uso do leite cru na produção de queijos artesanais como o queijo de coalho, tem sido uma das principais fontes de contaminação desse produto, que apresenta como principal agente contaminante a bactéria *Staphylococcus aureus*[25]. O queijo produzido com leite pasteurizado, denominado queijo de coalho, apresenta uma carga microbiana

frequentemente menor quando comparado aos queijos produzidos com leite cru. O processo de pasteurização causa uma diminuição do número de células viáveis e isso reflete em um produto final com maior qualidade e segurança microbiológica[26] .

Os queijos informais geralmente não são submetidos a controle de qualidade ou inspecionados com rigor, e sendo comercializados mais frequentemente em feiras livres por ambulantes, sob condições higiênico sanitárias precárias ou ausentes. Isto pode desencadear uma série de problemas na qualidade dos queijos, o que leva a altos níveis de contaminação microbiana, geralmente atribuídas à manipulação excessiva, à falta de boas práticas e ao alto teor de umidade. Vale salientar que a composição química característica favorece a multiplicação microbiana[27].

Desta forma, diferentes fatores favorecem a contaminação microbiológica de leite e derivados, sendo agravado quando a elaboração do produto é realizada com matéria prima sem o tratamento térmico recomendado para a sua conservação, pois se aumenta os riscos de ocorrência de contaminantes biológicos no produto final, o que ocorre com os produtos artesanais. Do mesmo modo, em seu estudo, Dias et al.[28] verificaram contaminação em queijos minas frescal artesanal e industrial produzidos na região Sul do estado de Goiás, além de constatarem 70% (7/10) das suas amostras em desacordo com o padrão estabelecido pela ANVISA para *Staphylococcus* coagulase positiva, conforme Resolução – RDC Nº 12 ,2001[24].

As contaminações em queijos artesanais produzidos com leite cru em sua maioria acontecem devido a falta de padronização no processo de produção, ausência de boas prática de fabricação e excesso de contato por parte dos manipuladores. Esses fatores associado a características físico-químicas dos produtos acabam favorecendo a proliferação microbiana. Com relação aos queijos industriais que são submetidos a processos térmicos, como a pasteurização, a contaminação microbiológica pode acontecer por falha nesse processo ou ainda ocorrer em etapas posteriores à pasteurização. O processo de embalagem incorreto, transporte e armazenamento inadequado podem propiciar uma contaminação[26,29,30].

Oliveira et al.[31] observaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 76,19% (32/ 42) de amostras de queijo de coalho do tipo A e tipo B comercializadas na cidade do Cabo de Santo Augustinho, no estado de Pernambuco e ressaltaram a importância da qualidade da matéria prima para obtenção de um produto final viável ao consumo da população.

Enquanto Marinheiro *et al.*[32] ressaltam a importância e o cuidado na elaboração, aplicação e fiscalização dos programas de boas práticas instalados na indústria de derivados de leite, tendo uma atenção redobrada em especial ao que se relaciona à higiene dos manipuladores, uma vez que eles manterão maior contato com os produtos, podendo assim se instalar uma contaminação cruzada. Ainda, salientam que a limpeza e desinfecção de equipamentos e superfícies que entram em contato com o alimento também deve ter atenção redobrada, pois podem servir como veículo de transmissão de microrganismos.

Neste estudo, isolou-se cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa de queijos de coalho e queijos de coalho artesanal para posteriormente serem submetidos aos testes de resistência antimicrobiana. Tratando-se de questões de saúde pública, pesquisas avançam alertando sobre a relevância da contaminação de queijos por considerar que estirpes dessa categoria, tais como *S. epidermidis, S. xylosus* e *S. haemolyticus*, são potencialmente produtoras de enterotoxinas *in vitro* e há registros de surtos de intoxicação alimentar, inclusive no Brasil, associados a essas espécies[4].

Em um estudo realizado por Stamford et al.[33], foi possível observar a presença de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa em leites produzidos ou comercializados no estado de Pernambuco. Desta forma, sendo um contaminante de leite, a presença destas cepas em queijos e outros derivados podem ser justificados quando a sua produção está associada ao uso de matéria prima de baixa qualidade e sem tratamento térmico.

A presença de *Staphylococcus* coagulase negativa como contaminante de queijos comercializados no Rio de Janeiro foi relatada no trabalho de Bolsan e Nascimento[10], que verificaram a presença destas bactérias em 82,2% das amostras de queijos analisadas, o que caracteriza um fator de risco para a ocorrência de intoxicação alimentar estafilocóccica.

Staphylococcus coagulase negativa está citado na literatura como patógeno presente em diversos processos infecciosos em humanos e animais, e que até pouco tempo não estavam relacionados a contaminação de alimentos nem a casos de intoxicação alimentar. De acordo com Becker et al[11], as principais espécies isoladas de alimentos foram *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* e *S. succinus*.

Em estudo realizado no estado do Rio de Janeiro, Marques[34] et al. detectaram *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) em 58% das amostras de leite proveniente de animais com mastite na região Sul-Fluminense, evidenciando que este subgrupo também está relacionado à contaminação de alimentos de origem animal.

A contaminação microbiana dos queijos artesanais é um grave problema de saúde pública, sendo considerado um dos principais veículos capazes de causar as DVA's[6]. A

qualidade microbiológica dos alimentos é de suma importância para garantir a segurança alimentar dos consumidores, pois os microrganismos contaminantes de alimentos, principalmente em produtos de origem animal, podem causar graves doenças na população[5].

Em relação à contagem de coliformes termotolerantes nas amostras de queijo de coalho, os resultados estão apresentados na tabela 2.2. Algumas amostras apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela RDC Nº 12 da ANVISA[24] de 5 x 10^2 UFC/g, sendo 40% (2/5) das amostras de queijo de coalho e 80% (4/5) das amostras de queijo de coalho artesanal porém nenhum isolado foi confirmativo para *E. coli*. A presença de coliformes em alimentos está relacionada a contaminações diversas, incluindo água de má qualidade, por ser considerado um patógeno de origem fecal ou ambiental.

Tabela 2.2 Contagem de coliformes termotolerantes das amostras de queijo coalho e queijo de coalho artesanal comercializado em cidades do estado de Pernambuco.

Amostras de queijo coalho	Análises				
	Coliformes termotolerantes (UFC/g)				
Tipo A	A1	A2	A3	A4	A5
	< 10 UFC/g	1,5 x 10^6	<10UFC/g	6,5 x 10^3	<10UFC/g
Tipo B	B1	B2	B3	B4	B5
	< 10 UFC/g	1,2 x 10^5	5,2 x 10^3	3,95 x 10^2	3 x 10^2

Nota: <10UFC/g representa ausência de crescimento microbiano, levando-se em conta os limites dos métodos utilizados.

Ruthes e Goularte[5], avaliando a qualidade microbiológica de queijos de diversas regiões do estado do Paraná, concluíram que as indústrias fabricantes de queijos necessitam melhorar suas condições higiênicos sanitárias para impedirem que cheguem aos consumidores produtos que possam causar qualquer dano à sua saúde, principalmente as empresas de pequeno porte, pois 20% dos produtos analisados apresentaram número elevado de coliformes termotolerantes.

Cruz et al[35], avaliando a qualidade de queijos minas artesanal comercializados em Montes Claros-MG, constataram que 30% das amostras analisadas apresentaram contaminação por coliformes a 45ºC, sendo que cerca de 12% apresentam contagem

superior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Enquanto Matsumoto et al[36] avaliaram 98 amostras de queijo de diversos tipos comercializados na cidade de São Paulo e relatam que destas, 26 amostras apresentaram contagens acima do permitido pela RDC nº 12 no que diz respeito a coliformes termotolerantes.

A presença de coliformes no queijo coalho sugere recontaminação após o tratamento do leite ou que o leite foi utilizado *in natura* sem tratamento térmico para a produção de seus derivados artesanais. Capibaribe et al.[37], analisando 83 amostras de queijo de coalho de estabelecimentos comerciais de Salvador - BA, relataram que 78 (94%) das amostras apresentavam contaminação por coliformes termotolerantes com a confirmação de *E. coli* em 65 (78,3%) das amostras.

Ao avaliar a qualidade do leite cru comercializado de maneira informal em feiras livres no município de Santa Maria-RS, Silveira e Bertagnoli[38], obtiveram como resultado número de coliformes acima do permitido pela legislação. A presença de coliformes termotolerantes foi constatada em todas as amostras de leite cru, neste sentido sendo o leite a matéria prima para o queijo isso reflete no produto final, com concentrações de microrganismos patógenos acima dos limites máximos estabelecidos.

Relata-se ainda que a presença de termotolerantes nas amostras de leites pasteurizados indica que houve falha em alguma etapa da ordenha, processamento ou envase do leite, o que mostra a necessidade de uma reavaliação dessas etapas, a fim de se identificar e diagnosticar todos os focos de contaminação, uma vez que amostras de queijo de coalho produzidas com leite pasteurizado também apresentaram valores acima do permitido pela legislação [39,26].

Análise do perfil de resistência

Das amostras de queijo de coalho foram isoladas 80 cepas de *Staphylococcus*, sendo 34 de *Staphylococcus aureus* e 46 de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Isto somado a 35 de coliformes termotolerantes, não sendo confirmado *E. coli*, totalizam 115 cepas isoladas. Em relação aos isolados de *S. aureus*, após o teste de susceptibilidade antimicrobiana, verificou-se que todos foram sensíveis a cloranfenicol, ciprofloxacino, amicacina e sulfazotrim, enquanto 82,3% (28/34) foram sensíveis a gentamicina. Em contrapartida 61% (21/34) apresentaram resistência à penicilina e 35,2% (12/34) a eritromicina.

Entre as cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijo de coalho, verificou-se resistência a penicilina, sendo, portanto produtoras de penicilinase, totalizando 33,3% (2/6). Nos queijos de coalho artesanais, 67,25% (19/28) foram resistentes a penicilina, 32,35% (11/28) a eritromicina e clindamicina, sendo consideradas cMLS, resistência constitutiva para macrolídeos, estreptograminas e licosaminas, enquanto 3,57% (1/28) foram resistentes apenas a eritromicina, sendo considerada MS por apresentar resistência apenas aos macrolídeos e estreptograminas.

Verificou-se ainda que 17,85% (5/28) das cepas oriundas de queijo de coalho artesanal apresentaram resistência a cefoxitina, sendo consideradas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), e destas, 3 foram consideradas cMLS, sendo categorizadas como multirresistentes de acordo com a resistência mínima a três classes de antimicrobianos[23].

S. aureus tem sido considerado um dos principais patógenos humanos, estando relacionado diretamente a infecções clínicas. Possui a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos, sendo MRSA uma das classes[40]. Estudos recentes relatam o isolamento de MRSA em alimentos de origem animal como carne suína e derivados, carne bovina, frango, entre outros produtos como leite e queijo. Isso deixa clara a importância em demonstrar a presença cada vez mais frequente de MRSA em alimentos de origem animal, tendo como finalidade alertar às autoridades de saúde pública e da agropecuária sobre a necessidade de adoção e/ou intensificação de medidas de controle uma vez que a resistência a cefoxitina implica na resistência a todos os β-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos[41, 42].

Dentre os antimicrobianos utilizados no teste de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *S. aureus* dos queijos de coalho e queijos de coalho artesanal, houve maior frequência de resistência a eritromicina (12 cepas), penicilina (21 cepas), clindamicina (11 cepas) como mostra a tabela 2.3. Tem sido relatado que o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos ou antimicrobianos é resultante do uso de antibióticos de maneira negligente e exacerbada, e segundo a WHO[43], nota-se que existe uma correlação direta entre maior consumo de antimicrobianos e maiores níveis de resistência e multirresistência microbiana.

Tabela 2.3. Percentual de resistência antimicrobiana dos isoladas de *S. aureus* de queijo coalho e queijos de coalhos artesanais, comercializados em cidades de Pernambuco.

Classes de antimicrobianos	Antimicrobiano	Resistência (%) (N= 34)	Sensibilidade (%) (N= 34)
Macrolídeos	Eritromicina	12 (35,2%)	22 (64,8%)
Penicilinases	Penicilina	21 (61,7%)	13 (38,3%)
Licosaminas	Clindamicina	11 (32,4%)	23 (67,6%)
Beta lactâmicos	Cefoxitina	5 (14,7%)	29 (85,3%)
Licosaminas	Cloranfenicol	0 (0%)	34 (100%)
Aminoglicosideos	Gentamicina	6 (17,6%)	28 (82,4%)
Tetraciclinas	Tetraciclina	8 (23,5%)	26 (76,47%)
Sulfonamidas	Sulfazotrim	0 (0%)	34 (100%)
Aminoglicosideos	Amicacina	0 (0%)	34(100%)
Quinolonas	Ciprofloxacino	0 (0%)	34(100%)

Das amostras dos queijos de coalho e queijos de coalho artesanal analisadas foi possível isolar 46 cepas de SCN, sendo 15 cepas provenientes dos queijos de coalho, correspondendo a 32,60% das amostras e 31 cepas oriundas dos queijos de coalho artesanais correspondendo a 67,40% das amostras. Todas as cepas apresentaram sensibilidade a ciprofloxacino, gentamicina, tetraciclina, amicacina, sulfazotrin e cloranfenicol.

Levando em consideração os principais fenótipos de resistência, verificou-se que entre as estirpes com resistência a penicilina ou produtoras de penicilinases, 13.33% (2/15) foram isoladas de queijo de coalho e 38.7% (12/31) de queijo de coalho artesanal. Ainda 13.33% (2/15) proveniente de queijo de coalho apresentam resistência a eritromicina e clindamicina, sendo considerada resistência constitutiva para macrolídeos, estreptograminas e licosaminas (cMLS), enquanto 9,67% (3/31) foram encontradas em queijos de coalho artesanais .

Verificou-se ainda que 6,66 % (1/15) dos isolados de queijo de coalho apresentaram resistência à meticilina (MRS), e 16,12% (5/ 31) entre os isolados do queijo de coalho

artesanais. Destas seis cepas consideradas MRS, quatro foram considerads cMLS, com base na resistência mínima a três classes de antimicrobianos, sendo portanto classificadas com perfil de multirresistência. Dentre os isolados do queijo de coalho artesanais, apenas 3,22% (1/31) foram considerados MS, ou seja, resistentes apenas a eritromicina.

Dentre os antimicrobianos usados no teste de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de SGN dos queijos de coalho e queijos de coalho artesanal, verificou-se maiores percentuais de resistência a penicilina com 30,4% (14 cepas), clindamicina com 23,9% (11 cepas), cefoxitina com 19,6% (6 cepas) e eritromicina com 13% (6 cepas), como apresentado na tabela 2.4.

Tabela 2.4 Percentual de resistência antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa obtidas de queijo de coalho e queijo de coalho artesanal, comercializados em cidades de Pernambuco.

Classe do antimicrobiano	**Antimicrobiano**	**Resistência (%) (N=46)**	**Sensibilidade (%) (N=46)**
Macrolideos	Eritromicina	6 (13%)	40 (87%)
Penicilinases	Penicilina	14(30,4%)	32 (69,6%)
Licosaminas	Clindamicina	11 (23,9%)	35 (76,1%)
Beta lactâmicos	Cefoxitina	9 (19,6%)	37 (80,4%)
Licosaminas	Cloranfenicol	0 (0%)	46 (100%)
Aminoglicosideos	Gentamicina	0 (0%)	46 (100%)
Tetraciclinas	Tetraciclina	0 (0%)	46 (100%)
Sulfonamidas	Sulfazotrim	0 (0%)	46 (100%)
Aminoglicosideos	Amicacina	0 (0%)	46 (100%)
Quinolonas	Ciprofloxacino	0 (0%)	46 (100%)

O perfil de sensibilidade antimicrobiana de 46 cepas de *Staphyloccocus* coagulase negativa isoladas de 10 amostras de queijo de coalho comercializadas em praias nordestinas foi avaliado por Rapini *et al*.[44], e os resultados corroboram com o presente estudo considerando os maiores percentuais de resistência à penicilina (100%), assim como os percentuais elevados para resistência a oxacilina (66,7%) e eritromicina (60%), além de identificarem resistência a tetraciclina (91%), vancomicina (75,5%), gentamicina (71,1%), cefalotina (48,9%) e sulfazotrim (26,7%).

Ao estudar resistência antimicrobiana em sistemas lácteos, PEXARA *et al*.[45] isolaram 45 cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos de reservatórios de leite ovino e caprino, e verificaram perfil de resistência destas cepas a tetraciclina em 8,9% (4/45), ciprofloxacino em 6,7% (3/45), ampicilina em 4,4% (2/45) e gentamicina em 2,2% (1/45), além de outros antibióticos utilizados, e ainda que 13,3% (6/45) das cepas foram classificadas como multirresistentes uma vez que apresentaram resistência até 5 diferentes antibióticos.

O uso inapropriado e indiscriminado de antimicrobianos tem sido apontado por alguns autores como sendo uma das principais causas da crescente taxa de bactérias resistentes, assim como para a maior prevalência de resistência a determinadas classes de antimicrobianos[46,47].

São crescentes os estudos que apontam SCN associados à intoxicações alimentares e cepas que apresentam perfil de resistência ou multirresistência. Coton *et al.*[48] realizou o isolamento de algumas cepas em alimentos prontos para o consumo e observaram além do mecanismo de virulência a presença de potenciais reservatórios de genes de resistência, justificando assim nossos achados. Ao analisar produtos prontos para consumo à base de carne, Fijalkowski, Peitler, Karakulska[49], isolaram nove espécies de SCN (*S. equorum*, *S. vitulinus*, *S. carnosus*, *S. succinus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. pasteuri*) sendo alguns isolados com fenótipo de resistência a antimicrobianos e capacidade de produção de enterotoxina.

Os processos de alteração genética que se encontram associados ao mecanismo de resistência acontecem pela transformação do gene no cromossomo (Alteração cromossômica) ou pela aquisição de um gene de resistência (Transferência horizontal), adquirido a partir de elementos genéticos moveis de outros microrganismos plasmídeos e bacteriófagos ou material genético extracelular[50,47]. Esses mecanismos de resistência associados ao uso de drogas antimicrobianas na agricultura, pecuária e psicultura com a finalidade de profilaxia e tratamento representam um risco à saúde pública, uma vez que ocorre uma seleção de cepas resistentes podendo contaminar humanos e posteriormente transferir genes de resistência aos patógenos e microrganismos comensais humanos[46].

Quanto ao resultado do índice de MAR para as cepas de *S. aureus* e SCN, foi possível observar uma resistência a até 5 agentes antimicrobianos (Tetraciclina, gentamicina, clindamicina, penicilina, eritromicina), ocorrendo valores de 0,1 a 0,5 correspondendo ao grau de resistência da cepa a um ou até cinco diferentes antimicrobianos, respectivamente, como mostra a tabela 2.5. Esses resultados mostram a presença de bactérias com perfil de multirresistência nas amostras de queijo de coalho e queijo de coalho artesanal, uma vez

que apresentaram resistência a mais de 3 antimicrobianos distintos, com base no índice MAR.

Tabela 2.5. Índice de Múltipla Resistência (MAR) correspondentes as cepas de *S. aureus e Staphylococcus* coagulase negativa isolados de queijos de coalho e queijo de coalho artesanal comercializados em cidades de Pernambuco.

Índice MAR	***S. aureus*** **(N= 34)**		***Staphylococcus*** **coagulase negativa (N=46)**	
	Cepas (%)	**Antimicrobianos**	**Cepas (%)**	**Antimicrobianos**
0,1	8(23,52%)	Tetraciclina, Eritromicina ou penicilina	6(13,04%)	Clindamicina penicilina ou eritromicina
0,2	4 (11,76%)	Penicilina e cefocitina ou tetraciclina e penicilina	5(10,86 %)	Penicilina e clindamicina ou cefoxitina e penicilina ou cefoxitina e clindamicina
0,3	4 (11,76%)	Clindamicina, penicilina e eritromicina ou Penicilina, gentamicina e tetraciclina	2 (4,35)*	Cefoxitina, clindamicina e penicilina ou Eritromicina, penicilina, clindamicina
0,4	3 (8,82%)	Cefoxitina, clindamicina, eritromicina e penicilina	4 (8,7%)	Cefoxitina, penicilina, clindamicina, eritromicina
0,5	5 (14,7%)	Tetraciclina, gentamicina, clindamicina, penicilina, eritromicina	-	-

Nota: 0,2 é igual a resistente a dois antimicrobianos; 0,3 é igual a resistente a três antimicrobianos; 0,4 é igual a resistente a quatro antimicrobianos; 0,5 é igual a resistente a cinco antimicrobianos.
*Apenas essas cepas são provenientes de amostras do queijo de coalho.

Dados semelhantes ao presente estudo também foram obtidos por Nunes *et al*. (2016) ao isolarem 10 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa com fenótipo de

resistência de queijo minas frescal comercializados em supermercados do sudeste brasileiro, pois verificaram que cinco cepas mostraram múltiplos índices de resistência antimicrobiana (MAR) de 0,73 a 0,93, sendo duas cepas com índices MAR de 0,53 e 0,40, e as demais com índices MAR de 0,26. Estes dados, segundo os autores, revelam a ocorrência e bactérias patogênicas e com perfil de resistência contaminando produtos lácteos, e que isto põe em risco a saúde da população[51].

A avaliação da multirresistência antimicrobiana segundo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e do Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) norte americano é baseado na classificação de Multidrogas resistentes (MDR) que é definido como a resistência microbiana a pelo menos um fármaco, em três ou mais categorias de antimicrobianos conforme descrito por Magiorakos *et al* [23].

Em relação á multirresistência antimicrobiana, considerando a resistência mínima a três classes de antimicrobianos, verificou-se neste estudo que entre as cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes queijos de coalho artesanal, 35,7% (11/28) apresentaram resistência mínima a três classes de antimicrobianos, respectivamente. Enquanto para as cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, 13, 3% (2/15) foram provenientes de queijo de coalho e 12,9% (4/31) do queijo de coalho artesanal.

A resistência a antimicrobianos bem como a multirresistência é um problema global, que traz grandes agravos a segurança nutricional e a saúde da população no geral, sendo a multirresistência a antimicrobianos frequentemente encontrada em produtos de origem animal e também em humanos[9]. Um estudo realizado pela organização mundial da saúde no ano 2014 pontuou como sendo cada vez maior o número de casos de contaminação por bactérias multirresistentes, e este fato reforça a necessidade de politicas públicas, estratégias de vigilância e controle sanitário a fim de reduzir a resistência e multirresistência aos antimicrobianos[42].

A prevalência de microrganismos de relevância clínica como *E. coli* e *S. aureus* resistentes e/ou multirresistentes a vários antimicrobianos contaminando produtos alimentícios está cada vez maior. Isso representa um grande problema e ameaça para a saúde pública em todo o mundo, devido à persistência da circulação de cepas de bactérias resistentes no ambiente podendo levar a possível contaminação de água e alimentos, podendo tornar-se um meio pela qual estas bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos são transmitidas para humanos, dificultando a terapêutica[52].

Ao serem submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, observou-se que 45,71% (16/36) das cepas de termotolerantes apresentaram resistência apenas a ampicilina, sendo 4 cepas isoladas do queijo coalho e 12 cepas do queijo de coalho artesanal.

Verificou-se ainda que 1 cepa (2,85%) foi resistente a cefoxitina e 1 cepa (2,85%) foi resistente a sulfazotrin e imepenem. Desta forma, os isolados de termotolerantes não apresentando fenótipo de resistência com significado expressivo.

Considerando o fenótipo principal de resistência para enterobactérias, realizou-se o teste preliminar para ESBL (betalactamases de espectro estendido) com discos de ceftazidina e cefotaxima, conforme sugerido pelo CLSI 2015, contudo não houve cepas com este fenótipo. Quanto ao resultado do índice de MAR foi possível observar que apenas uma cepa apresentou índice de MAR de relevância 0,2 sendo resistente a duas classes distintas de antimicrobianos.

A presença de microrganismos patogênicos com fenótipos de resistência e multirresistência encontrados nos queijos de coalho demonstra a necessidade da melhoria no padrão de produção dos pequenos laticínios, bem como a melhoria da fiscalização pelos órgãos competentes, visando diminuir a contaminação desses produtos.

2.6 Conclusões

- Os queijos de coalhos comercializados em cidades do Estado de Pernambuco apresentam em sua maioria níveis insatisfatórios de células viáveis de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliforme termotolerantes, ficando em desacordo com o que estabelece a legislação vigente, mesmo aqueles produzidos com leite pasteurizado.
- Quanto aos perfis de resistência a antimicrobianos entre os isolados de *Staphylococcus aureus*, foram encontradas nos queijos de coalho cepas com perfil de resistência à penicilina, enquanto nos queijos de coalho artesanal, em ordem descrente por frequência houve cepas com resistência a penicilina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, cefoxitina e tetraciclina.
- Quanto aos perfis de resistência a antimicrobianos entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), em ordem decrescente por frequência, observou-se nos queijos de coalho e queijo de coalho artesanal cepas com perfil de resistência a penicilina, eritromicina, clindamicina e cefoxitina.
- Em queijo de coalho apenas as cepas isolas de Staphylococcus coagulase negativa apresentaram perfil de multirresistência, enquanto em queijos de coalho

artesanal tanto cepas *Staphylococcus aureus* como de Staphylococcus coagulase negativa foram identificadas com esse perfil.

- Os isolados de termotolerantes apresentaram resistência a amicacina, cefoxitina, sulfazotrim e imepenem, contudo não expressaram (Betalactamase de espectro estendido) perfil ESBL uma vez que foram sensíveis as cefalosporinas utilizadas.
- A presença de microrganismos patógenos resistentes e multirresistente em alimentos reforça a necessidade de medidas mais eficazes por parte dos órgãos governamentais, a fim de evitar agravos à saúde da população.

2.7 Referências

1- DANTAS, S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de patos, PB.** 29 de fevereiro de 2012. p.79, **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

2- ALMEIDA, S.L; PAIVA JÚNIOR, F. G; GUERRA, J.R. F; Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista interdisciplinar de gestão social.** V.2, n.2, maio/ ago, 2013.

3- ADAGRO, Agencia de Defesa e Fiscalização Agropecuária do estado de Pernambuco- ADAGRO. **PORTARIA ADAGRO Nº 007, DE 04 DE JANEIRO DE 2018**.

4- EMBRAPA. Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Fraude no leite: leite de qualidade x qualidade de vida.** Órgão oficial da associação brasileira dos criadores de girolando. Ano xv. Nº 88, 2013.

5- RUTHES, L. D.; GOULARTE, M. M. M. Qualidade microbiológica de queijos de diversas regiões do estado do Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, In: CONGRESSO LATINO AMERICANO 6, E CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 12, 2013, Gramado. Gramado-RS, v. p. ed. 218-219, 2013.

6- TOZZO, K.; GUIMARAES, I.M.; CAMARGO, C.A. Avaliacão microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel – PR. **Higiene Alimentar**, v.29, n.244/245, p.149-154, 2015.

7- TONDO,E.C.;LIMA.G.C;LOIKO,M.R; CASARIN, L.C;Assessing the epidemiological data of *staphylococcus aureus* food poisoning occurred in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal Microbiology**;v.44(3), p.759–763, 2013.

8- BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência nacional de vigilância sanitária**, sisvan 2016.

9- DOYLE, M. E.; Multidrug-Resistant Pathogens in the Food Supply. **Foodborne Pathogens and Disease.** v. 12, n.4,p. 261-279 2015.

10- Fleming L. R_; Bolzan, D. N; Nascimento, J. S. Substâncias antimicrobianas produzidas por cepas coliformes ativas contra patógenos veiculados por alimentos. **Patógenos e Doenças Transmitidas por Alimentos**. V.7, N. 3, 2010 .

11- BECKER, K. *et al.* Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The "*mec* alphabet" with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. **International Journal of Medical Microbiology,** v. 304, n. 7, p. 794-804, Oct. 2014.

12- SANTOS, A. L. *et al. Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.6, p.413-423, 2007.

13- BORGES, A. *et al.* New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, Basel, Switzerland, v.21, n.7, p.877, 2016.

14- Erickson, K. E.; Otoupal, P. B. & Chatterjee, A. Gene expression variability underlies adaptive resistance in phenotypically heterogeneous bacterial populations. **ACS Infectology Diseases**., v.1(11). P.555-67, 2015.

15- Lebeaux, D.; Ghigo, J. M. & Beloin, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology. Molecular. Biology. Review**. v.78(3), p.510- 43, 2014.

16- Da Silva, G. J. & Domingues, S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen Acinetobacter baumannii. **Microorganisms**, v.4(3) n.29, 2016.

17- Organização Mundial da Saúde (OMS). Resistencia a los Antibióticos. Génova, **Organização Mundial da Saúde**, 2017. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/.

18- Rosa D.L.S.O *et al.* Genes toxigênicos, antibiograma e antagonismo de *Staphylococcus* spp. **Vigilância Sanitária em Debate**. V.3(1) p.37-42, 2015.

19- BRASIL. **Ministério da Agricultura**. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas e para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF, 2003.

20- KORNACKI, J. L., JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: **APHA**,. 676 p. cap. 8, p. 69-82, 2001.

21- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI documento M02-A11**, 2015.

22- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic indexing of Escherichia coli to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology, Washington**, v. 46, p. 165-170, 1985.

23- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 18, p.268-281, 2012.

24- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.1-48, 10 de junho de 2006.

25- SOUSA, A.Z.B.; ABRANTES, M.R.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; LIMA, P.O.; LIMA, R.N.; ROCHA, M.O.C.; PASSOS, Y.D.B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p.30-35, 2014.

26- ROCHA, K.L;,OLIVEIRA, A.P; CARVALHO, J.W.P. Avaliação da qualidade do leite "in natura", pasteurizado e esterilizado (uht), comercializado em Barra do Bugres-MT**, ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 1 1 4, 2016.

27- AMORIM, A. L. B. C., COUTO, E. P., SANTANA, A. P., RIBEIRO, J. L.; FERREIRA, M. D. A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz,** 73, 364-367, 2014.

28- DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia-MS, v. 3, n. 3, p. 57-64, jul./set. 2016.

29- UEHARA, S.M. N; análise microbiológica de leite pasteurizado. P. 48, 2016. **Trabalho de conclusão de curso**, Universidade Tuiuti do Paraná. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde Curso Medicina Veterinária.

30- SILVA, F. R.; SANTANA, C.M; MELO,W.F; TALABERA, G.G; SARMENTO, W.E; SARMENTO SOBRINHO,W.; Sá,J.A.; MACHADO, A.V.; Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. **PUBVET**. v.11, n.4, p.333-341, Abr. 2017.

31- OLIVEIRA, K.A.; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J.E.; MELO, L.E.H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

32- MARINHEIRO, M. F. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.3, p.1329-1334. 2015.

33- STAMFORD. T. L.M; SILVA. C.G. M; MOTA. R.A; CUNHA NETO. A; Enterotoxigenicidade de Staphylococcus spp. isolados de leite in natura, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos,** Campinas, v.26(1), p.41-45, jan.-mar. 2006.

34- MARQUES, V. F. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *S.* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161-170, fev. 2013.

35- CRUZ, A. L. M. *et al.* Qualidade microbiológica de Queijos Minas Artesanal comercializado em Montes Claros-MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.24, n.190-191, p.136-139, 2010.

36- MATSUMOTO. A.Y, *et al.* CONTAMINAÇÃO POR COLIFORMES FECAIS EM QUEIJOS PRONTOS PARA O CONSUMO, **Saúde em Foco**, Edição nº: 08/Ano: 2016.

37- CAPIBARIBE, C.; GUIMARÃES, A.G.; MOTA, N.S.; RIBEIRO, N.S.; REGO, F.L.T. Coliformes totais, coliformes termotolerantes e Escherichia coli em queijos de coalho comercializado em Salvador, BA. **Higiene Alimentar**, v.24, n.184-185, p.143-147, 2010.

38- SILVEIRA, M.L., BERTAGNOLLI MARIA MICHELIN. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Revista Visa em Debate [online],** v. 2, n.2, p.75-80, 2014.

39- MARTINS, J.N. SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; ALBUQUERQUE, E.M.B.Qualidade microbiológica de leites pasteurizados comercializados na cidade de Morada Nova, Ceará. **Revista Verde [online]**, v. 7, n. 3, p. 119-123, 2012.

40- RIBEIRO. I.F; SILVA. S. F.R; SILVA. S.L.; RIBEIRO. T. R; ROCHA. M. M. N. P; STOLP .A. M. V; Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* em estudantes universitários**, Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.**,v.35(2), p.301-304, 2014.

41- CERQUEIRA. E.S; *ALMEIDA. R. C. C;* Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática, **Revista Instituto Adolfo Lutz**.; v.72(4), p.268-81, 2013.

42- SERGELIDIS. D . , ANGELIDIS. A. S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a controversial food-borne pathogen. **Letras Aplicadas em Microbiologia.** v. 64 (6), p. 409-418. 2017.

43- World Health Organization. **Antimicrobial resistance: Global report on surveillance**, 2014.

44- 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 Zootenia.** v.56, n.1, p.130-133, 2004.

45- PEXARA, A. *et al.* Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw ovine and caprine milk in Greece. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 345–357, 1 mar. 2016.

46- COSTA, A.L.P. Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequencias e Estratégias De Contenção. 63 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

47- LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de Antimicrobianos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.34, n.1, p.77-84, 2016.

48- COTON, E. *et al.* Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 221-229, Feb. 2010.

49- FLEMING. L. R; BOLZAN. D. N; BANDEIRA. S. O.; NASCIMENTO. J. S.; Quantificação e resistência a antibióticos de *staphylococcus* isolados de queijos. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2; n. 1/2 (2010).

50- PALMER, A. C.; KISHONY, R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 4, p. 243–8, abr. 2013.

51- NUNES, R.C.S et al. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science** Vol. 99 No. 4, 2016.

52- 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. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 74 (4):399-409, 2015.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciaram que os queijos de coalho comercializados em diferentes cidades do estado de Pernambuco apresentaram valores acima do que é permitido pela legislação vigente, RDC Nº 12 da ANVISA, no que diz respeito a *Staphylococus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes para queijos de coalho. Isto possivelmente encontra-se relacionado ao processo de fabricação, que em sua maioria acontece em estabelecimentos pequenos, sem os devidos equipamentos e condições higiênicas necessárias, bem como a falhas na manipulação, armazenamento e transporte do alimento.

A forma de comércio informal também é um ponto importante para a multiplicação de microrganismos patogênicos, uma vez que ocorre em feiras livres e comércio ambulante, onde os queijos de coalho permanecem expostos, principalmente quando ocorre a venda fracionada do produto sem os devidos cuidados ou refrigeração.

Quanto a análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiano, ficou evidente a ocorrência de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa com perfil de resistência e multirresistência nos queijos analisados.

Essas questões evidenciam a necessidade de medidas e intervenções de órgãos de vigilância e fiscalização a fim de sanar/diminuírem o número de casos de produtos alimentícios contaminados com bactérias patogênicas com ou sem perfil de resistência, visto que em ambas as situações trazem danos a saúde da população.

REFERÊNCIAS

ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. São Paulo: ABIQ, 2016 Disponível em: <www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/producao-de-queijos-no-brasil-perde-folego-em-2015-100443n.aspx>. Acesso em: 19 jul. 2018.

ALMEIDA, S. L.; PAIVA JÚNIOR, F. G; GUERRA, J. R. F. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. **RIAE - Revista Ibero-Americana de Estratégia**, São Paulo, v.9, p.74-97, 2010.

ALMEIDA, S. L; PAIVA JÚNIOR, F. G; GUERRA, J. R. F; Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista interdisciplinar de gestão social,** Salvador, v.2, n.2, maio/ago. 2013.

BARRETO. N. S. E. *et al.* Queijos artesanais como veiculo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza v.10, n.1 p. 55-67, jan./mar. 2016.

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. 2013. 42f. Dissertação **(**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BORGES, M. F. *et al.* 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**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BORGES, A. *et al.* New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, Basel, Switzerland, v.21, n.7, p.877, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, Seção 1, p.1, 16 jul. 2001a.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001.** Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de coalho. Brasília, DF. Ministério da Agricultura, 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.1-48, 10 de junho de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. In: _____. **Boletim Eletrônico Epidemiológico.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, **Balança comercial brasileira:** Dados consolidados. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico de Intoxicação Alimentar / Surto de Doenças de Transmissão Alimentar (DTA)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, SISNAN.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BLAIR, J. M. *et al.* Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, London, v.13, p.42-51, 2015.

CARDOSO, P. *et al.* Resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no Brasil. **Arquivos de Veterinária**, Belo Horizonte, v.30, n.2, p.104-108, 2014.

COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos:** Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção. Macapá, 63f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.

CHALITA, M. A. N. *et al.* Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.39, n.6, jun. 2009.

DANTAS, S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de patos, PB.** 2012. 79 f, Dissertação (Mestrado Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, 2012.

DOYLE, M. E. Multidrug-Resistant Pathogens in the Food Supply. **Foodborne Pathogens and Disease,** Nova York,v.12, n.4, p.261-279, 2015.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A. *et al.* **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p.457-474.

FOOD SAFETY BRAZIL. **Surtos Alimentares no Brasil**. [s. l.]: [s. n.], 2016. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-janeiro-de-2016/#ixzz4OJFda9Xg>. Acesso em: 19 jul. 2018.

GUIMARÃES, A. G. *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, n.2, p.259-65, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro: IBGE, 2015. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/>. Acesso em: 19 jul. 2018.

LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M.; Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Journal Food Science Technology**, Campinas, v.7, p.287-312, 2016.

LUCHESI, S. B. Vigilância para Staphylococcus aureus produtores de toxinas em leite**. Pesquisa &Tecnologia**, São Paulo, v.9, n.1, Jan-Jun, 2012.

MARQUES, V. F. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *S.* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.161-170, 2013.

MARTINS, M. F. *et al.* Fraude no leite: leite de qualidade x qualidade de vida. **O Girolando,** Uberaba, v. 15, n. 88, p. 28-32, 2013.

MONTEIRO, F. C. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* como Controle de Qualidade no Processamento de Carnes**. 2015. 103f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, Paraná, 2015.

MORAES, A. L.; ARAÚJO, N. G. P.; BRAGA, T. L. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, São José, v.5, n.1, p. 122-132, 2016.

MCEWEN, S. A; FEDORKA-CRAY, P. J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infect of Diseases**, Oxford, v.34, p.93-106, 2002.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos.** Rio de Janeiro: OPAS/OMS, 2009.

PERNAMBUCO. Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução nº002, de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco**, Recife, 20 de abril de 1999.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.27. n.2, p.293-300, 2004.

PINTO, M. S. *et al.* Segurança alimentar do queijo Minas Artesanal do Serro, Minas Gerais, em Função da adoção das Boas Práticas de Fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v.39, n.4, p.342-347, 2009.

RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo de coalho. **Segurança Alimentar e Nutricional,** Campinas, v.18, n.2, p.60-66, 2011.

SANTOS, A. L. *et al. Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.6, p.413-423, 2007.

SEBRAE. **Queijos Nacionais – Leite e Derivados.** Estudo de Mercado Sebrae, Minas Gerais: Editora ESPM, 2008.

SILVA, G.; SILVA, A. M. A. D.; FERREIRA, M. P. B. **Processamento de leite**. Recife: EDUFRPE, 2012.

SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil – 2005 a 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.77, n.7 p.4-10, 2010.

SILVA, F. R. *et al.* Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. **PUBVET**, Maringá, v.11, n.4, p.333-341*,* abr. 2017.

SOUSA, A. Z. B. *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

TONDO, E. C. *et al.* Assessing the epidemiological data of *Staphylococcus aureus* food poisoning occurred in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal Microbiology**, Londres, v.44, n.3, p.759–763, 2013.

TOZZO, K.; GUIMARAES, I. M.; CAMARGO, C. A. Avaliação microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel – PR. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.29, n.244/245, p.149-154, 2015.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy world markets and trade**. Washington: USDA, 2011.

VASCONCELOS, F. R. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.405-410, 2010.

WITTE, W; Selective pressure by antibiotic use in livestock. **Journal of Antimicrobiology Agents**, Amsterdã, v.16, p.19-24, nov. 2000.

ANEXO A – Normas para publicação

Revista *Alimentação Humana* – Normas de publicação

Alimentação Humana é a revista oficial da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação (SPCNA) e publica artigos originais de investigação e de revisão, na área dasCiências da Nutrição e Alimentação. A revista *Alimentação Humana* subscreve os requisitos para apresentação de artigos a revistas biomédicas elaboradas pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (*International Commitee of Medical Journal Editors*; ICMJE), disponível em

www.icmje.org. A consideração dos artigos para publicação implica conformidade com as normas de

publicação.

Apresentação e estrutura do artigo

O artigo pode ser redigido em **português ou inglês**. O texto deve ser apresentado em Word para Windows, folha tamanho A4 (210x297 mm) com margens não inferiores a 2,5 cm, espaçamento entre linhas não inferior a um espaço e meio e redigido em letra tipo *Arial* tamanho 11 ou *Times New Roman* tamanho 12. Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente no canto superior ou inferior direito, sendo a página de rosto a n.º 1. O artigo não deve ultrapassar as 30 páginas.

A **página de rosto** deve conter o título e a identificação do(s) autor(es). O **título** (e subtítulo, se aplicável) não deve ultrapassar os 150 caracteres (incluindo espaços). Deve ser conciso e não conter quaisquer abreviaturas. A identificação do **autores** deve ser feita como apelido seguido das iniciais do(s) primeiro(s) nome(s); caso o artigo tenha mais de um autor, as identificações devem ser separadas por vírgulas e as categorias profissionais e instituições onde os autores exercem a sua actividade devem ser numeradas.

Exemplo:

Apelido A1, Apelido BB1,2

1 Instituição X

2 Instituição Y

A identificação do(s) autor(es) apenas deve constar da página de rosto. Cada autor deverá ter contribuído, cumulativamente, para: (i) concepção e projecto, análise de dados ouinterpretação de resultados e (ii) redacção ou revisão crítica do artigo. Todos os autores devem aprovar a versão do artigo submetida para publicação e a versão final a ser publicada. A primeira página deverá incluir referência a quaisquer **patrocínios ou subsídios** e/ou **conflitos de interesses**. A falta de menção a estes elementos será entendida como indicando a sua inexistência. Devem também ser referidos o nome e contactos (incluindo necessariamente morada e *e-mail*) do autor responsável pela correspondência. Finalmente, deve ser indicado um **título breve** (*running head*) com não mais de 50 caracteres (incluindo espaços).

A segunda página deve ter no topo o título em português e em inglês, seguindo-se os **resumos** em português e em inglês (*abstract*). O primeiro resumo deve corresponder ao idioma de redação do artigo. Cada resumo não deve exceder os 1500 caracteres (incluindo espaços). Os resumos podem ser ou não estruturados e não devem conter referências, abreviaturas ou notas de rodapé. No final de cada resumo devem ser apresentadas entre três e dez **palavras-chave** (*key-words*). Nas páginas seguintes o texto deve ser dividido em **secções**. Nos artigos de investigação as secções são habitualmente as seguintes: Introdução; Metodologia; Resultados; Discussão; Conclusões; Referências. Esta divisão pode ser substituída por qualquer outra que, no entender dos autores, melhor se adapte à apresentação do trabalho.

Figuras, tabelas e quadros

As figuras, tabelas e quadros são numerados (separadamente) por ordem de referência no texto. A legenda deve preceder a figura, tabela ou quadro correspondente. Nas tabelas e quadros deve ser evitado o uso de linhas verticais e restringido o de linhas horizontais.

Exemplo:

Quadro 1 – Legenda do quadro 1

A* B

C 1 2

D 3 4

* Observação ou nota informativa

Estes elementos devem ser inseridos ao longo do texto nos locais desejados. A resolução das figuras (incluindo gráficos), deverá ser suficiente para permitir a sua adequada impressão a preto e branco. As tabelas e quadros deverão ser editáveis, isto é, não devem ser apresentados sob a forma de figuras. Poderá ser solicitado aos autores o envio das figuras, quadros e/ou tabelas nos programas em que foram originalmente concebidos.

Referências

As referências devem ser numeradas (numeração árabe) por ordem de introdução no texto e formatadas de acordo com o estilo bibliográfico recomendado pela ICMJE. Os autores são responsáveis pela exactidão e rigor das referências utilizadas.

Exemplos:

Artigo

Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. Physiol Rev. 2005 Apr;85(2):679-715.

Livro

Foster GD, Nonas CA, editors. Managing obesity: a clinical guide. Illinois: American Dietetic Association; 2004.

Capítulo de livro

Spear BA. Nutrition in adolescence. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. Krause´s food, nutrition, & diet therapy. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. Chap. 11, pp. 284-301.

Nas referências com mais de 6 autores, devem-se mencionar os primeiros 6 seguidos de *et al*. Os documentos electrónicos devem incluir a data de consulta.

Declaração de originalidade e de cedência de direitos

A originalidade da investigação e as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos autores; os artigos aceites para publicação passarão a ser propriedade da SPCNA. Os textos submetidos devem ser acompanhados de declaração de originalidade e de cedência dos direitos de propriedade do artigo. Esta declaração deve explicitar o título do artigo e ser

assinada pelo autor principal ou pelo autor nomeado para contacto com a revista. Propõe-se o seguinte modelo:

Título do artigo enviado para publicação

O(s) autor(es) declara(m) que o artigo supra-identificado é de autoria própria e resulta de investigação original, não publicado em parte e em todo ou submetido para publicação noutra publicação. Mais, declaram que o texto/o artigo é alheio a quaisquer conflitos de interesses. O(s) autor(es) cedem o

direito de propriedade do artigo publicado na revista Alimentação Humana, mantendo os direitos de autor.

Data

Assinatura

Sempre que se verifique conflito de interesses, a frase correspondente deve ser substituída por outra que os explicite. Quaisquer outros comentários ou observações que o(s) autor(es) considerem relevante serem transmitidos ao Corpo Editorial deverão ser incluídos nesta declaração.

Submissão do artigo

O artigo e versão digitalizada da respectiva declaração de originalidade e de cedência de direitos de propriedade deverão ser enviados por *e-mail* para: ah.spcna@gmail.com.

Processo de revisão

O artigo submetido para publicação será submetido a apreciação por pelo menos dois revisores. A revisão é feita anonimamente e resulta na aceitação ou rejeição do artigo. Os revisores podem propor alterações de conteúdo e/ou de forma aos autores, bem como solicitar esclarecimentos adicionais, ficando a publicação do artigo condicionada à efetivação das alterações e resposta aos pedidos de esclarecimento. Após recepção dos comentários dos revisores, os autores dispõem de um prazo de duas semanas para enviar

uma nova versão do artigo, anexando documento com a resposta às dúvidas dos revisores e/ou quaisquer esclarecimentos adicionais. A proposta de alterações e/ou solicitação de esclarecimentos não implica a posterior aceitação do artigo.

Provas tipográficas

As provas tipográficas serão, sempre que possível, enviadas aos autores, que devem proceder à sua revisão no prazo de uma semana. Nesta fase, apenas se aceitam modificações que decorram da correção de gralhas tipográficas. O não cumprimento do prazo implica a aceitação pelos autores da revisão das provas efetuada pelos serviços da revista.