

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO MANTEIGA COMERCIALIZADO EM FEIRA PÚBLICA DA CIDADE DE MACAPÁ, AP.

Antonio Carlos Souza da Silva Júnior ✉

Ediluci do Socorro Tostes Malcher

Anne do Socorro Santos da Silva

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá. Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia. Macapá, AP.

Jaqueline Freitas do Nascimento

Bruno dos Santos Barroso

Instituto Macapaense do Melhor Ensino Superior. Macapá, AP

✉ jr_bio2005@yahoo.com.br

RESUMO

O comércio informal de leite e derivados possui relevante impacto na saúde pública, pelo risco de transmissão de doenças alimentares. O *S. aureus* configura-se um dos principais patógenos associados à contaminação de queijos. O objetivo do presente trabalho, portanto, foi estudar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de amostras de queijo manteiga comercializadas nas feiras públicas de Macapá. Foram obtidas 20 amostras de queijo comercializados em feiras livres da cidade de Macapá, AP. O isolamento foi realizado em Agar Baird Parker e para confirmação das colônias típicas, foi realizada a coloração de Gram, identificação

bioquímica, catalase, coagulase e DNase. Posteriormente, pela técnica de disco-difusão foram testados os seguintes antibióticos: Gentamicina 10 µg (GEN), clorafenicol 30 µg (CLO), tetraciclina 30 µg (TET), eritromicina 15 µg (ERI), norfloxacinina 10 µg (NOR), nitrofurantoina 300 µg (NIT), sulfametoxazol/trimetoprim 1,25/23,75 µg (SUT), oxacilina 1 µg (OXA), vancomicina 30 µg (VAN). Das amostras avaliadas, 60% estavam fora do padrão para *S. aureus*, mas mostraram que os antibióticos NIT, SUT, TET, CLO e OXA foram eficazes frente a todas as cepas, por outro lado, das 12 estirpes avaliadas, cinco (41,67%) apresentaram resistência total a ERI, 3 (25%) apresentaram resistência total a GEN e uma (8,33%) apresentou resistência

intermediária a NOR. Estes resultados demonstram a importância de uma legislação mais rigorosa para o fortalecimento do Sistema de Vigilância Sanitária, com o intuito de fiscalizar alimentos oferecidos à população e seus lugares de comercialização, diminuindo os riscos à população que consome esses produtos.

Palavras-chave: *Queijo.*

Microbiologia de alimentos.

Comercialização.

ABSTRACT

The informal trade in milk and dairy products has a significant impact on public health because of the risk of transmission of foodborne diseases. S. aureus is one of the main

pathogens associated with cheese contamination. The present work aimed to study the antimicrobial resistance profile of S. aureus isolated from samples of butter cheese commercialized in the public fairs of Macapá. twenty samples of cheese marketed in free markets of the city of Macapá. Isolation was performed in Baird Parker agar and for confirmation of typical colonies, Gram staining, biochemical identification, catalase, coagulase and DNase were performed. Subsequently, by the disc-diffusion technique, the following antibiotics were tested: Gentamicin 10 µg (GEN), Chlorphenicol 30 µg (CLO), tetracycline 30 µg (TET), erythromycin 15 µg (ERI), norfloxacin 10 µg (NOR), nitrofurantoin 300 µg (NIT), sulfamethoxazole / trimethoprim 1,25 / 23, 75 µg (SUT), oxacillin 1 µg (OXA), vancomycin 30 µg (NPV).

Of the samples evaluated, 60% were non-standard for S. aureus but showed that NIT, SUT, TET, CLO and OXA antibiotics were effective against all strains, on the other hand, of the 12 strains evaluated, 5 (41.67%) presented total ERI resistance, 3 (25%) presented total resistance to GEN, and 1 (8.33%) presented intermediate resistance to NOR. These results demonstrate the importance of stricter legislation for the strengthening of the Sanitary Surveillance System, with the purpose of inspecting food offered to the population and their places of sale, reducing the risks to the population that consumes these products.

Keywords: Cheese. Food microbiology. Marketing.

INTRODUÇÃO

Os queijos produzidos artesanalmente, dentre os produtos lácteos, são considerados o veículo mais frequente de patógenos pelo principal

fato de serem produzidos, a maioria, com leite não pasteurizado (LÓPEZ-PEDEMONTE et al., 2006). O comércio informal de leite e derivados possui relevante impacto na saúde pública, pelo risco de transmissão de doenças alimentares (FLEMING et al., 2010). *Staphylococcus aureus* configura-se como um dos principais patógenos associados à contaminação de queijos (CREMONESI et al., 2007).

Vale ressaltar que o manipulador pode carregar de maneira assintomática este micro-organismo (RAPINI et al., 2004), fato este que, aliado à falta de controle higienicossanitário, pode levar à contaminação do produto final (SOUZA et al., 1998).

O *S. aureus* é o principal representante dos estafilococos coagulase positiva, são ativos biologicamente, produzindo diversas proteínas, toxinas e enzimas que possuem a capacidade de causar infecções e/ou intoxicações alimentares (SCHLIEVERT et al., 2000; MADIGAN et al., 2004; VERAS et al., 2008). Além disso, tem-se verificado que muitas estirpes podem carregar genes de resistência à antibióticos, o que pode levar a um quadro infeccioso mais grave, pela dificuldade no tratamento (WOLSON, 2006; VERMELHO et al., 2008).

A provável origem do gene de resistência, apesar de controversa, aponta micro-organismos ambientais como sua fonte primária (AARESTRUP, 2006). E na era dos antibióticos que foi acelerada a disseminação desse gene para micro-organismos comensais e patogênicos. Atualmente, diversos países estão propondo programas de monitoramento de isolados resistentes em alimentos em função de sua transmissão pelo consumo de alimentos de origem animal (AARESTRUP; SCHWARZ, 2006; VARMA, 2005).

Neste contexto, destacada a posição relevante de bactérias como

agente etiológico de doenças infecciosas, a resistência antimicrobiana e seu respectivo impacto na saúde pública, que o presente trabalho visou estudar o perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* isolados de amostras de queijo manteiga comercializadas nas feiras públicas de Macapá-Amapá.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de queijo foram compradas na feira do Produtor Rural unidade Buritizal, onde foram embaladas pelos próprios vendedores e transportadas na embalagem original em caixas isotérmicas, até o laboratório de microbiologia do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA. O tempo entre a coleta e a análise não excedeu 60 minutos.

A unidade analítica utilizada foi de 20g da amostra em 180mL de Salina Peptonada 0,1% (H₂O_p) como recomenda a ISO 6887-1 (1999), sendo homogeneizada e chamada de 10⁻¹. Na segunda diluição (10⁻²) foi transferido asépticamente 1mL da primeira diluição (10⁻¹) para 9mL do diluente. Para a diluição subsequente, procedeu-se de maneira similar, transferindo-se 1mL da diluição anterior para 9mL de diluente.

A partir da diluição 10⁻³, foi inoculado 0,1mL distribuindo na superfície de placas de Ágar Baird-Parker (BP) e foram incubadas, invertidas, a 35-37°C/45-48h. Após incubação realizou-se contagem somente das colônias típicas de *Staphylococcus*, que são circulares, pretas ou cinza escuras, com 2-3mm de diâmetro (em placas cheias são menores, com cerca de 1,5mm), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.

Para confirmação das colônias

Tabela 1 - Quantificação de *S. aureus* em amostras de queijo manteiga comercializadas em feiras públicas na cidade de Macapá, AP.

Amostra	<i>S. aureus</i>
	(UFC/g)
Q1	1,12 x 10 ⁵
Q2	1 x 10 ⁴
Q3	3 x 10 ³
Q4	4 x 10 ³
Q5	9 x 10 ³
Q6	6 x 10 ³
Q9	4,2 x 10 ⁴
Q10	3,7 x 10 ⁴
Q12	3,8 x 10 ⁴
Q14	5 x 10 ³
Q16	3 x 10 ³
Q20	1,1 x 10 ⁴

típicas, foi realizada a coloração de Gram; aquelas que se apresentavam como cocos Gram positivos agrupados em cachos, foram submetidas à identificação bioquímica, catalase, coagulase e DNase (ZURITA et al., 2010). Ainda foram realizadas as provas de utilização de glicose e maltose, teste de Voges-Proskauer, utilização de manitol e crescimento em NaCl a 7,5% com o intuito de diferenciar *S. aureus* de outros *S. Coagulase-positivos*.

O perfil de resistência dos *S. aureus* isolados foi avaliado seguindo a técnica de disco difusão (CLSI, 2015), onde foram utilizados os discos comerciais dos seguintes antibióticos: Gentamicina 10 µg (GEN), cloranfenicol 30 µg

(CLO), tetraciclina 30 µg (TET), eritromicina 15 µg (ERI), norfloxacin 10 µg (NOR), nitrofurantoina 300 µg (NIT), sulfametoxazol/trimetoprim 1,25/23,75 µg (SUT), oxacilina 1 µg (OXA), vancomicina 30 µg (VAN).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 amostras de queijo manteiga avaliadas, 60% estavam contaminadas por *S. aureus* (Tabela 1), com contagem variando entre 3x10³ UFC/g e 1,12x10⁵ UFC/g. Dessa forma, encontravam-se fora do padrão determinado pela legislação vigente, considerando-se que a RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) preconiza

o número máximo permitido de 10³ UFC/g, sendo considerados como inapropriados para o consumo humano.

Os altos valores encontrados neste trabalho estão em consonância com a literatura, Almeida Filho et al. (2000), avaliando queijo minas frescal comercializado na cidade de Poços de Caldas – MG, verificaram 50% das amostras avaliadas com contagens acima do permitido para *S. aureus*. Os autores justificaram alta contaminação pela manutenção dos produtos em exposição na temperatura ambiente, mesma condição encontrada neste estudo.

Ferreira et al. (2011) demonstraram que, 90% das amostras avaliadas de queijo comercializadas em

Tabela 2 - Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *S. aureus* isolados de queijo manteiga comercializado em feiras públicas na cidade de Macapá, AP.

ANTIBIÓTICOS	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	Nº isolados	%	Nº isolados	%	Nº isolados	%
Nitrofurantoina	12	100%	0	-	0	-
Sulfametoxazol/Trimetoprim	12	100%	0	-	0	-
Norfloxacin	12	100%	0	-	0	-
Tetraciclina	12	100%	0	-	0	-
Cloranfenicol	12	100%	0	-	0	-
Eritromicina	7	58,33%	0	-	5	41,67%
Gentamicina	09	75%	0	-	3	25%
Oxacilina	12	100%	0	-	0	-

feiras livres da cidade de Uberlândia, MG, estavam com contagens acima do padrão. No trabalho de Souza et al. (2011), 93,3% das amostras avaliadas comercializadas no município de Sacramento, MG apresentaram-se insatisfatórias. Loguercio e Aleixo (2001) mostraram que 96,67% dos queijos analisados, obtidos no centro comercial de Cuiabá/MT, estavam fora do padrão determinado pela AN-VISA.

O *S. aureus*, em altas densidades em alimentos, constitui risco à saúde humana, por causa do seu potencial toxigênico (FRANCO; LANDGRAF, 2004). E, diante do exposto anteriormente, é provável que este queijo, que é consumido sem tratamento térmico nenhum, esteja veiculando este micro-organismo patogênico.

Nos últimos anos, já foram desenvolvidos alguns estudos que demonstram a resistência do *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos, destacando-o como multirresistente a pelo menos três classes de antibióticos (LOEFFLER; LLOYD, 2010; PENNA, 2011). Por este motivo, uma estirpe de cada isolado, identificado das amostras testadas, foi submetida à avaliação do perfil de resistência a antibióticos, como pode ser visto na Tabela 2.

Os resultados para os isolados de *S. aureus* mostraram que os antibióticos NIT, SUT, TET, CLO e OXA foram eficazes frente a todas as cepas, por outro lado, das 12 estirpes avaliadas, cinco (41,67%) apresentaram resistência total a ERI, três (25%) apresentaram resistência total a GEN, e uma (8,33%) apresentou resistência intermediária a NOR como demonstrado na Tabela 2.

A multirresistência é mais comum em *S. aureus* proveniente de amostras clínicas, onde, segundo Resch et al. (2008), cerca de 70% das bactérias de infecções hospitalares são resistentes a pelo menos, uma das

drogas utilizadas convencionalmente no tratamento. Outro fator importante que pode ser observado neste trabalho, foi a resistência a ERI, droga comumente utilizada na terapêutica humana e veterinária (GUIMARÃES et al., 2012).

No presente estudo o antibiótico com menor eficácia foi a ERI com cinco (41,67%) estirpes resistentes. Este pode ser considerado um número baixo se comparado com o trabalho realizado por Rapini et al. (2004), em que 86,4% das cepas avaliadas de *S. aureus* eram resistentes a ERI.

Por outro lado, não foi encontrada nenhuma estirpe resistente a OXA, mesmo que apenas sugestivo pela técnica de disco-difusão, sendo considerados *S. aureus* Meticilina sensíveis (MSSA). O micro-organismo resistente (MRSA), que designa linhagens de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com antibióticos β -lactâmicos (STURMER, 2008), é considerado em infecções hospitalares, o maior problema clínico e epidemiológico desde a década de 90 (RODRIGUES, 1997). A maioria dos estudos de isolados de MRSA, a partir de alimentos de origem animal, apresenta baixíssimas frequências de isolamento ($\leq 8\%$), segundo Cerqueira e Almeida (2013).

A grande relevância do achado de bactérias resistentes a antibióticos, perpassa pela capacidade desses micro-organismos transferirem os genes de resistência antimicrobiana a outras bactérias, seja da própria espécie ou não, independentemente de serem patogênicas (RAPINI et al., 2004). Neste caso, isso pode ocorrer assim que o alimento contaminado por micro-organismos resistentes, alcançarem o trato gastrointestinal.

CONCLUSÃO

A presença de *S. aureus* acima do limite estabelecido pela legislação vigente em 60% das amostras

avaliadas, classifica o produto como impróprio para o consumo humano. Altas contagens demonstram que o tratamento térmico do leite está sendo ineficaz, ou, que o queijo está sendo produzido a partir de leite não pasteurizado, estando em desacordo com o preconizado pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura.

Este estudo condiz com a literatura, que vem demonstrando, cada vez mais, um aumento da resistência a antibióticos de bactérias isoladas a partir de alimentos, o que pode contribuir para casos mais graves de infecções, além da dificuldade no tratamento.

Desta maneira, é importante uma legislação mais rigorosa para o fortalecimento do Sistema de Vigilância Sanitária, com o intuito de fiscalizar alimentos oferecidos à população e seus locais de comercialização, diminuindo os riscos à população que consome esses produtos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, FM; SCHWARZ, S. Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. In: AARESTRUP, FM. (Ed.). **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington DC: ASM Press, p. 187- 212. 2006.
- AARESTRUP, FM. The Origin, Evolution and Local and Global Dissemination of Antimicrobial Resistance. In: AARESTRUP, FM. (Ed.). **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington DC: ASM Press, p. 339-359. 2006.
- ALMEIDA FILHO, ES; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Rev Saúde Pública**. São Paulo, v.34, n.6, p.578-580, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v34n6/3570.pdf>>. Acesso em: 15/06/2016.
- BRASIL, Ministério da Saúde - Agência

- Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **DO** [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 16/03/2016.
- CERQUEIRA, ES; ALMEIDA, RCC. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v.72, n.4, p.268-81, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**: Approved Standard. M02-A12. 12^a ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CREMONESI, P et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.586-591, 2007.
- FERREIRA, RM et al. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**. Londrina, v.5, n.5, ed. 152, art. 1021, 2011. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/72aef9618590756ec693d24b9a1edad.pdf>>. Acesso em: 15/07/2016.
- FLEMING, LR et al. Quantificação e resistência a antibióticos de *Staphylococcus* isolados de queijos. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2, n. ½, p.13-19, 2010.
- FRANCO, BDGM; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Atheneu, São Paulo, ed.1, 182p. 2004.
- GUIMARÃES, AG et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v.71, n.2, p.259-265, 2012.
- ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilution for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions**, 1^a ed. The International Organization for Standardization, 1999.
- LOEFFLER, A; LLOYD, DH. Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community? **Epidemiology and Infection**, n.138, p.595-605, 2010.
- LOGUERCIO, AP; ALEIXO, JAG. Microbiologia do queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.31, n.6, p.1063-1068, 2001.
- LÓPEZ-PEDEMONTE, T; BRINEZ, WJ; ROIG-SAGUÉS, AX; GUAMIS, B. Fate of *Staphylococcus aureus* in cheese treated by ultrahigh pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **Journal of Dairy Sciences**, v.89, p.4536-4544, 2006.
- MADIGAN, MT; MARTINKO, JM; PARKER, J. **Brock: Biology of Microorganisms**. 10th Ed, Prentice-Hall, 2004.
- PENNA, B. Prevalência clínica de *Staphylococcus* sp de origem canina e sua resistência in vitro aos antimicrobianos. **Clínica Veterinária**, n.90, p.82-88, 2011.
- RAPINI, LS et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq Bras de Med Vet e Zootec**, v.56, n.1, p.130-133, 2004.
- RESCH, M; NAGEL, V; HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p.99-104, 2008.
- RODRIGUES, EAC. Histórico das Infecções Hospitalares. In: RODRIGUES, EAC. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle**. São Paulo: Sarvier; p.3-27, 1997.
- SCHLIEVERT, PM et al. Pyrogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infection and Immunity**, v.68, n.3630-3634, 2000.
- SOUZA, CM; BRAGANÇA, MG; COLI, MCM. **Manual de boas práticas de fabricação de pão de queijo**. Belo Horizonte: CETEC, 1998. 54p.
- SOUZA, V et al. Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de queijo minas artesanal. **Rev Hig Alimentar**. v.25, n.194/195, p.894-896, 2011.
- STURMER, FCR. **Caracterização parcial do elemento ccr em *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados no sul do Brasil**. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul/PUC; Porto Alegre, 2008.
- VARMA, JK et al. Antimicrobial-resistant non-typhoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **Journal Infectious Diseases**. v.191, p.554-561, 2005.
- VERAS, LC et al. Study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.410-415, 2008.
- VERMELHO, AB; BASTOS, MCF; BRANQUINHA, M. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 158p.
- WOLSON, W. Holding back the tide of antibiotic resistance. **Chemistry and Biology**, v.13, p.1-3, 2006.
- ZURITA, J; MEJÍA, C; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v.14, suplemento 2, p.97-107. 2010.