

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
IZABELA RODRIGUES BRITO LIMA

**PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE
ESTAFILOCOCOS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL**

FORMIGA – MG
2017

IZABELA RODRIGUES BRITO LIMA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE
ESTAFILOCOCOS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária do UNIFORMG,
como requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio

FORMIGA – MG

2017

IZABELA RODRIGUES BRITO LIMA

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE
ESTAFILOCOCOS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR-MG.,
como requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio

Orientador

Prof. Dr. José Barbosa Junior

UNIFOR-MG

Prof. Dr. José Antônio Viana

UNIFOR-MG

Formiga, 07 de julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Como será difícil agradecer a todos... Afinal, foram anos de convivência, amizade, conversas, conselhos, lamentações, dúvidas, discussões e, com certeza, muito aprendizado antes e durante minha permanência neste curso.

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda proteção, força e coragem, me mostrando sempre os caminhos para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida.

Em especial agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio, o parabênzo pela excelente orientação indispensável para a conclusão deste trabalho. A você, o meu muito obrigada!

À doutoranda Letícia Goulart de Oliveira, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, do ICB-UFMG, do professor Jacques Robert Nicoli.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da construção deste sonho... Muito obrigada!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de estafilococos isolados de queijo minas artesanal. Para tanto, 10 amostras de *Staphylococcus* spp. previamente isoladas de queijos artesanais provenientes de propriedades rurais localizadas na região da Serra do Salitre (MG). O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade. Os resultados encontrados demonstraram que, utilizando-se a metodologia preconizada para análise de antibiograma para *Staphylococcus* spp, na amostra APA, verificou-se resistência a dois antimicrobianos: Tetraciclina 30µg e Imipenem 10µg. Foi observada resistência também da amostra QD1T à Tetraciclina 30µg. De modo geral, as outras oito amostras de *Staphylococcus* spp. mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos utilizados. Ao final do estudo concluiu-se que as amostras de queijos provenientes da Serra do Salitre (MG) demonstraram índices relevantes de isolados bacterianos sensíveis aos antimicrobianos testados e, apenas duas amostras apresentaram-se resistentes a dois tipos de antimicrobianos.

Palavras chave: Microbiologia de alimentos. Bactérias patogênicas. Sensibilidade microbiana.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the antimicrobial susceptibility profile of staphylococci isolated from Minas artisanal cheeses. For this, 10 samples of *Staphylococcus* spp. previously isolated from artisanal cheeses from rural properties located in the Serra do Salitre (MG) region. The antibiogram was performed according to the susceptibility technique. The results showed that, using the methodology recommended for antibiogram of *Staphylococcus* spp, in the APA sample, resistance to two antimicrobials was verified: Tetracycline 30 μ g and Imipenem 10 μ g. Resistance was also observed to sample QD1T to Tetracycline 30 μ g. In general, the other eight samples of *Staphylococcus* spp. were sensitive to the antimicrobials used. At the end of the study, it was concluded that the cheese samples from Serra do Salitre (MG) showed relevant indices of bacterial isolates sensible to tested antimicrobials, and only two samples were resistant to two types of antimicrobials.

Key words: Food Microbiology. Pathogenic bacteria. Microbial sensitivity.

LISTA DE ABREVIACES

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – *American Tipe Culture Collection*
BAL - Bactérias cido-ltico
BHI - *Brain Heart Infusion*
BP - *Baird Parker*
CLSI – *Clinical Laboratory and Standards Institute*
EUA – Estados Unidos da América
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IPHAN – Instituto do Patrimnio Histórico e Artístico Nacional
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
ML – Mililitro
OMS – Organização Mundial de Saúde
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
 μL – Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização do município de Serra do Salitre	18
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis de susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI	20
Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade de <i>Staphylococcus</i> spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 O queijo	12
2.2 Queijo Minas artesanal	14
2.3 Fontes de contaminação do queijo	15
2.4 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Caracterização bioquímica	18
3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	19
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A produção de queijos artesanais no Brasil teve início durante o período colonial e, é possível verificar algumas regiões que atualmente mantêm os mesmos processos de fabricação daquela época (GUIMARÃES et al., 2012).

O queijo Minas artesanal é produzido artesanalmente a partir de leite cru na própria fazenda, não passando por nenhum tratamento térmico, além disso, não há acompanhamento tecnológico, podendo resultar na obtenção de um produto de composição variada e características de sabor, aroma, corpo e textura bastante diferenciadas, o que pode comprometer sua qualidade final, pois o queijo feito com leite cru pode ter altas contagens de coliformes fecais, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e outros microrganismos patogênicos que podem causar danos a quem os consome devido à veiculação de bactérias patogênicas e toxinas (BORELLI et al., 2006).

Falhas ocorridas durante a ordenha e o processamento, aliadas a temperaturas inadequadas de conservação no comércio varejista, são fatores que têm contribuído para a comercialização dos produtos lácteos com características microbiológicas fora dos padrões regulamentares (RUTHES; GOULARTE, 2013).

Frente a esta problemática, os estafilococos são os microrganismos mais comuns presentes em alimentos como os queijos e, seu principal problema está associado à produção de enterotoxinas consideradas as principais causas de intoxicação alimentar (COSTA, 2010b).

Por ser uma bactéria amplamente distribuída na natureza, é imprescindível que os manipuladores de alimentos tenham um controle higiênico adequado a fim de evitar a transmissão da bactéria tanto por parte do homem quanto pelos animais, como no caso do gado leiteiro acometido por mastite causada por *Staphylococcus* spp. (GUIMARÃES et al., 2012).

Além das patologias transmitidas por *Staphylococcus* serem brandas e desaparecerem rapidamente, tornando o portador assintomático, estas bactérias usualmente apresentam grande resistência a antimicrobianos. Este fato demonstra a complexidade microbiota presente em queijos artesanais que pode ser composta tanto por microrganismos indesejáveis quanto por microrganismos necessários à fabricação do queijo, como as bactérias pertencentes ao grupo das bactérias ácido-lático (BAL) (OLIVEIRA, 2012).

A segurança alimentar constitui uma preocupação para os consumidores e para os órgãos responsáveis pela saúde pública. A produção artesanal de queijos é uma atividade comum no meio rural do país. Este produto disponível para comercialização pode representar um risco à saúde pública se não forem seguidos com rigor cuidados higiênicos sanitários durante o processo de produção (DIASI et al., 2006).

Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo identificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de estafilococos isoladas de queijo minas artesanal da Serra do Salitre, MG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O queijo

A descoberta do queijo, de acordo com os gregos da antiguidade foi atribuída a Aristeu, rei da Arcádia que, segundo a lenda, um árabe nômade, levava em suas viagens pelo deserto tâmaras secas e leite dentro de um cantil feito de estômago seco de carneiro, onde com o passar do tempo, ao consumir seu alimento, verificou que este havia se solidificado e possuía agradável sabor. Entretanto, apesar de haver inúmeras histórias sob a forma como foi obtido o queijo, o que se sabe é que este alimento é amplamente consumido até os dias atuais (PERRY, 2003).

Historicamente, é sabido que na época áurea do Império Romano, a arte de produzir queijos foi aperfeiçoada e esta técnica ganhou status elevado ao produzir queijos de qualidade inigualável. Estes utilizavam técnicas sofisticadas de maturação e eram produzidos em espaços próprios destinados à sua fabricação e cura. Neste período, os queijos eram privilégio da nobreza, sendo servidos em banquetes e, também aos soldados que pertenciam ao exército romano. Na Idade Média a fabricação de queijos passou a ser especialidade dos monges cristão, os quais criaram vários tipos de queijos, sendo que muitos deles ainda são consumidos até hoje. No período renascentista, o queijo perdeu seu status, devido ao fato de ser considerado pouco saudável, no entanto, seu consumo foi retomado pouco tempo depois (PERRY, 2003).

No ano de 1267 fundou-se na França a primeira “Fruitières” que foi a precursora dos laticínios que produziram tempos mais tarde os queijos Beufort, Emmenthal e Comte. A produção em massa dos queijos só foi iniciada a partir do século XIX, no entanto, a primeira loja especializada no comércio de queijos só foi inaugurada no século XX, na França (PERRY, 2003).

Apesar do processo de produção de queijos ser básico, os ingredientes utilizados e o seu tempo de maturação, é que irão diferenciar seu sabor e qualidade. Ao analisar os processos de maturação utilizados é possível identificar aproximadamente 1000 tipos de queijo, sendo que destes, 400 são fabricados em território francês. No Brasil, o estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de queijos e, é responsável por consumir metade da produção nacional. Os

fabricantes de queijos mineiros são na sua maioria pequenas queijarias familiares, localizadas em municípios do interior do estado (PERRY, 2003).

Em sua composição, o queijo pode ser definido como sendo um concentrado de produtos de origem láctea, onde são verificadas a presença de proteínas, sais minerais, carboidratos, lipídeos, cálcio, fósforo e vitaminas. Por este motivo é considerado um alimento de alto valor nutritivo. Sua classificação tem como base características relativas ao tipo de leite utilizado em sua fabricação, a forma de coagulação, consistência, quantidade de gorduras, tipo de casca e tempo de cura (PERRY, 2003).

De acordo com o Ministério da Agricultura (MAPA), o queijo é definido como sendo um produto fresco ou maturado, obtido através da segregação entre soro de produtos lácteos que sofrem um processo de coagulação por meio de ação do coalho, enzimas de bactérias específicas para este fim, além de ácidos orgânicos isolados ou em combinações. Ressalta-se que a qualidade destes produtos deve ser atestada a fim de evitar que estes possam levar contaminação a quem os consumir. A legislação ainda ressalta que, a definição destinada ao queijo deve ser dada de maneira exclusiva aos produtos lácteos que possuam em sua constituição gorduras e/ou proteínas originárias de outras fontes (BRASIL, 2017).

A classificação feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece uma classificação para os queijos tendo como base seu teor de gordura e teor de umidade. Tem-se assim, escalas que compreendem os queijos denominados quanto à dureza, como extra duros, queijos macios, e queijos denominados em função do teor de gordura. É importante ressaltar que os processos de fabricação do queijo são controlados desde o local onde os animais são criados, a fim de verificar o seu manejo higiênico e sanitário, garantindo, assim, a segurança alimentar deste produto que é de responsabilidade de todos os envolvidos no seu processo produtivo no que diz respeito aos aspectos mencionados (MANUAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR DE QUEIJOS TRADICIONAIS, 2008).

Minas Gerais se destaca como o mais importante estado produtor de queijos artesanais do Brasil, entretanto, outros estados como os da região Nordeste, produzem queijos artesanais nacionalmente conhecidos como o queijo coalho e o queijo manteiga, ou na região Sul, onde é produzido o queijo colonial ou serrano e, no estado do Mato Grosso do Sul, onde é produzido o queijo caipira (SILVA, 2007).

2.2 Queijo Minas artesanal

O queijo em suas variações foi adaptado aos costumes das diversas culturas ao redor do mundo e, desta forma atualmente há uma infinidade de tipos deste produto. No Brasil, as técnicas de fabricação de queijo foram trazidas pelos portugueses na época da colonização. O leite proveniente do gado bovino trazido para cá, também nesta época, além de alimento foi utilizado para fabricação do queijo tipicamente artesanal, a partir da receita portuguesa da Serra da Estrela (IEPHA/MG, 2002).

Desde o século XVIII, os exploradores de ouro durante suas expedições ensinavam a fabricação do queijo pelas fazendas de Minas Gerais que passavam e, por este motivo o produto ganhou a denominação de Queijo Minas, o qual era desenvolvido utilizando-se a técnica existente na Serra da Estrela em Portugal, variando apenas no que concerne ao coagulante utilizado. O queijo Serra da Estrela era produzido contando com o uso de extrato de flores e broto de um tipo de planta de coloração amarela e folhas cinza, repleta de espinhos e caule ereto revestido de pelos, considerado praga da lavoura. Já o queijo Minas era preparado mediante a aplicação de coagulante desenvolvido a partir do uso de recipiente fabricado pelo estômago seco e salgado de bezerros e cabritos e cabrito (IEPHA/MG, 2002).

No estado de Minas Gerais, da lei Estadual nº. 14185 de 31 de janeiro 2002 considera o Queijo Minas Artesanal, aquele confeccionado mantendo a tradição histórica e cultural da região do Estado onde é produzido, utilizando-se leite de vaca integral, fresco ou cru, que é retirado e beneficiado na propriedade onde é feita sua produção. O queijo Minas possui consistência firme, coloração e sabor característicos, massa uniforme, isenta de corantes ou conservantes, podendo ainda apresentar ou não olhaduras mecânicas. Foram todos esses fatores que, aliados ao processo secular de fabricação, deram fama ao queijo Minas Artesanal e uma garantia de sustentabilidade neste segmento de agricultura familiar. Por esse e outros motivos, em 15 de Maio de 2008 o Conselho Consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), aprovou por aclamação, o registro do modo de fazer queijo-de-minas como patrimônio imaterial do Brasil.

2.3 Fontes de contaminação do queijo

O queijo, assim como qualquer outro produto utilizado na alimentação, pode ter sua segurança alimentar comprometida pela ação de agentes que realizam a contaminação física, química ou por meio de microrganismos indesejáveis. Por este motivo, é imprescindível que qualquer tipo de contaminação seja evitada em todos os processos que elencam a cadeia produtiva, incluindo-se nela a distribuição e o consumo. Os processos de contaminação podem ocorrer em função do uso de materiais inadequados durante o processo de fabricação, o não uso de equipamentos que evitem o contato de cabelo e mãos ou resíduos presentes nas mãos dos manipuladores (PINTO et al., 2009).

O controle utilizado a fim de evitar contaminações é estabelecido em manuais de Boas Práticas de Higiene. Assim, por meio de suas determinações é possível evitar a contaminação por meio de substâncias tóxicas. É importante ressaltar que, com o desenvolvimento da agroindústria, houve também um aumento na quantidade de pesticidas e, estes quando drenados acumulam-se nas cadeias alimentares, podendo contaminar o produto final obtido. A contaminação química também pode ocorrer dentro das fábricas, caso estas não realizem corretamente a limpeza dos materiais utilizados. No que concerne os queijos, há ainda o uso de antibióticos na alimentação dos animais ou no próprio leite, antes deste ser enviado para seu preparo. Entretanto, estas substâncias podem trazer prejuízos diversos à saúde dos consumidores (MANUAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR DE QUEIJOS TRADICIONAIS, 2008).

Neste contexto, a presença de resíduos de medicamentos no leite acarreta vários problemas de saúde nas populações e, somam-se a estes o fato do aumento do tempo de coagulação decorrente das mudanças do pH, cuja diminuição não ocorre adequadamente, elevam o risco de contaminação por coliformes. Os queijos que não são fermentados de forma adequada não baixam seu pH a níveis desejados, no corte da coalhada de queijos registram-se maiores perdas de caseína e gordura no soro com redução do rendimento na fabricação, a cura do queijo também é prejudicada por não haver participação das bactérias lácticas para as reações bioquímicas desejáveis (TRONCO, 2003).

Além disso, há também a ação de amins biogênicas que são resultado a atividade bacteriana sobre os aminoácidos presentes no queijo, os quais dependendo das concentrações causam alterações fisiológicas nos indivíduos e, por este motivo é

imprescindível a realização de seu controle para garantir a qualidade microbiota do leite cru e de sua cura quando transformado em queijo, assegurando que este processo se mantenha sob controle. Ressalta-se que, a contaminação microbiológica é responsável por altos índices de toxinfecções provenientes de alimentos tanto de origem animal quanto vegetal, devido ao contato com superfícies contaminadas que dão início ao processo de contaminação. Assim, uma vez contaminado, o produto será acometido pela multiplicação dos microrganismos, conferindo a características anormais ao produto de qualidade garantida. Portanto, a segurança alimentar deve ser resguardada a fim de zelar pela qualidade do queijo produzido artesanalmente (MANUAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR DE QUEIJOS TRADICIONAIS, 2008).

2.4 *Staphylococcus coagulase positiva*

O gênero *Staphylococcus*, pertence à família Micococaceae, é composto por cocos Gram positivos, imóveis, mesófilos, não esporulados e agrupados irregularmente na forma de cachos. Catalase positivos, possuidores de metabolismo respiratório e fermentativo, são anaeróbios facultativos. Atualmente o gênero comporta um total de 33 espécies. Dentro destas, *Staphylococcus aureus* pode ser diferenciado por coagular plasma, produzir Dnase termoestável e fermentar o manitol (DOWES; ITO, 2001).

A produção de coagulase com indicação de patogenicidade do *S. aureus* é amplamente difundida, cepas coagulase-negativas produtoras de enterotoxinas têm sido isoladas, mas há pouca informação sobre seu papel na intoxicação alimentar (LISITA, 2005).

O microrganismo tolera altas concentrações de sal (25%), é resistente a processos de secagem e pode crescer e produzir enterotoxinas em produtos que tenham atividade de água muito baixa. São duas as categorias de patologias produzidas pelo *S. aureus*: a) quadros infecciosos provocados pela ação direta do microrganismo, podendo ser localizados ou septicêmicos; b) quadros toxêmicos provocados pela ação de suas toxinas, como síndrome tóxica e intoxicação alimentar (LISITA, 2005).

A fonte mais provável de contaminação primária por *S. aureus* é o próprio ser humano. Uma grande parte da população humana possui *S. aureus* como parte da microbiota do nariz, pescoço e mãos e, conseqüentemente, essas pessoas que

manuseiam os alimentos podem contaminar o produto cru, os equipamentos e/ou o produto final. No Brasil, tem-se observado vários surtos de intoxicação alimentar com queijo causados por *S. aureus*. Apesar de o queijo Minas artesanal ter boas propriedades físico-químicas, suas características higiênico-sanitárias podem ser deficientes, pois uma grande parte é feita de maneira artesanal, sem muitos cuidados higiênicos, repercutindo assim na saúde do consumidor (CORBIA et al., 2000).

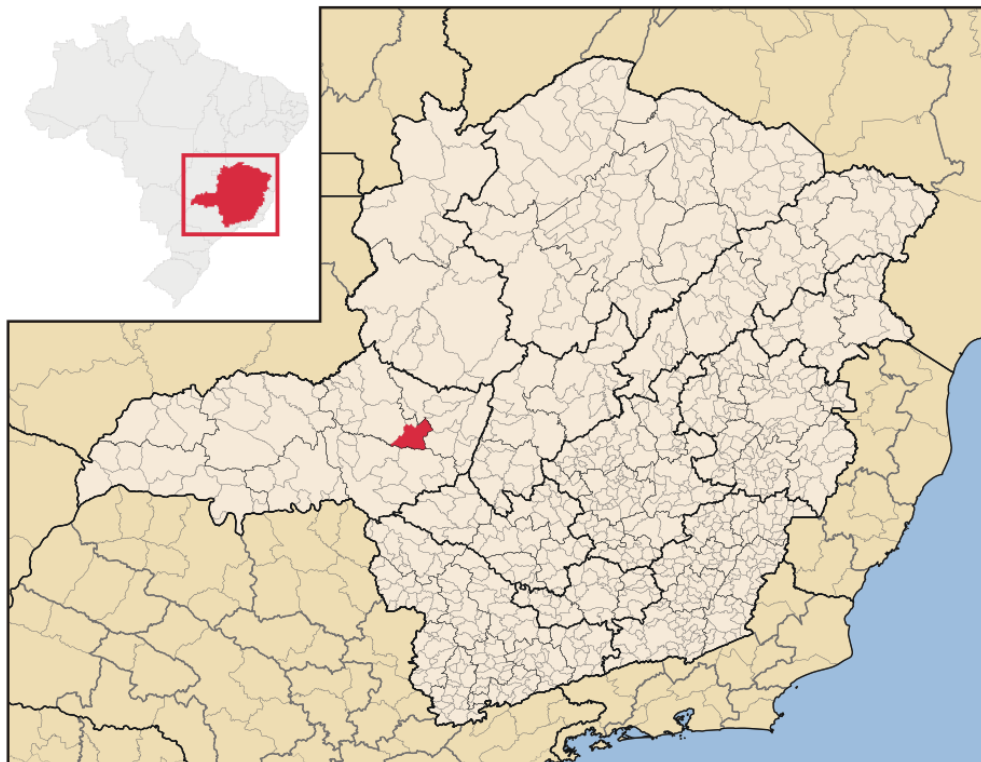
A intoxicação alimentar causada pelo *S. aureus* é mais caracterizada por uma toxemia do que por uma infecção. A doença é causada pela ingestão do alimento contaminado pela pré-toxina e não pelo efeito direto da bactéria. Após a ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada, o desenvolvimento dos sintomas de vômito, diarreia, dores abdominais, eventualmente dor de cabeça e prostração surgem rapidamente. O período de incubação é de 30 minutos a oito horas, todavia a média varia entre 2-6 horas. Esta rapidez é decorrente da ingestão da toxina já pré-formada e não a sua produção após a ingestão (CORBIA et al., 2000).

A intoxicação alimentar abrange todas as classes sociais em todo o mundo. Dentre as bactérias passíveis de serem encontradas no leite, pode-se destacar o *S. aureus*, já que vários fatores propiciam condições favoráveis para a contaminação deste alimento, tais como, a sua ubiquidade na natureza, o baixo nível socioeconômico dos ordenhadores, muitas vezes portadores assintomáticos deste microrganismo patogênico e possuidores de maus hábitos higiênicos, além da elevada prevalência de *S. aureus* como agente etiológico da mastite bovina no mundo (GOMES; GALO, 1995)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 amostras de *Staphylococcus* spp. previamente isoladas de queijos artesanais provenientes de propriedades rurais localizadas na região da Serra do Salitre (MG) (FIG. 1) município localizado na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Até 1953 era um distrito do município de Patrocínio.

Figura 1 – Localização do município de Serra do Salitre



Fonte: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Serra_do_Salitre#/media/File:MinasGerais_Municip_Serra doSalitre.svg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Serra_do_Salitre#/media/File:MinasGerais_Municip_Serra_doSalitre.svg)

Posteriormente ao isolamento, as amostras foram armazenadas em meio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e glicerol e submetidas ao congelamento (-20°C), onde permaneceram conservadas desde então até o seu uso.

3.1 Caracterização bioquímica

Após o descongelamento, 100µL de cada amostra foram coletados e adicionados a tubos contendo 4mL de caldo BHI (Acumedia, Lansing, EUA), e incubados por 24 horas a 37°C. Após a ativação dos micro-organismos, estes foram

inoculados em placas contendo ágar Baird Parker (BP) (Difco, Detroit, EUA) de onde, após incubação por 48 horas a 37°C, foram coletadas as colônias para o teste de Gram e para o teste de produção da catalase. A partir dos cultivos em caldo BHI, as amostras foram submetidas às provas de coagulase, segundo Silva et al. (2010). Colônias típicas (colônias enegrecidas e com formação de halo em ágar BP) e atípicas (colônias brancas a acinzentadas, sem formação de halo em ágar BP) foram coletadas e utilizadas no presente estudo. Essa parte do trabalho foi realizado com o auxílio da doutoranda Letícia Goulart de Oliveira, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Posteriormente, as análises foram realizadas o Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, do ICB-UFMG, do professor Jacques Robert Nicoli.

3.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade, pelo princípio de difusão da droga, utilizando-se discos contendo concentrações específicas de antimicrobianos e medindo-se o diâmetro dos halos de inibição conforme proposto inicialmente por Bauer et al. (1966), preconizado pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) e publicado traduzido pela ANVISA (ANVISA, 2005).

Após ativação em caldo BHI, as amostras de *Staphylococcus* spp. foram cultivadas em ágar BHI, sendo, posteriormente, transferidas para tubos contendo 3,5 mL de salina 0,85% para obter-se concentração correspondente a 0,5 na escala Mc Farland (108 UFC/mL). Em seguida, foram feitos inóculos utilizando-se zaragatoas estéreis embebidas na solução supracitada sobre a superfície de placas tipo pizza (14cm de diâmetro) contendo o mesmo ágar. Logo após, foram distribuídos os discos (*Laborclin*, Paraná, Brasil) contendo os antimicrobianos. As placas foram incubadas em aerobiose, durante 24 horas a 35°C.

Foram utilizadas as seguintes drogas e suas respectivas concentrações: ciprofloxacina 5µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, tetraciclina 30µg, ampicilina 10µg, imipenem 10µg, cefoxitina 30µg, ceftriaxona 30µg, amoxicilina 10µg, trimetropim 1,25µg e sulfametoxazol 23,75µg.

Após a incubação, com auxílio do paquímetro digital, foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. A cepa de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como micro-organismo controle neste teste.

Nesse caso, os resultados não foram submetidos à análise estatística, pois os resultados expressos de forma quantitativa foram utilizados para uma classificação qualitativa dos micro-organismos como sendo sensíveis, intermediários ou resistentes às drogas antimicrobianas testadas, de acordo com o 15º suplemento informativo da ANVISA (2005) que pode ser observado no TAB. 1.

Tabela 1 - Níveis de susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI

Antimicrobiano	Sensível	Moderado	Resistente
Tetraciclina (30µg)	≥19	15-18	≤14
Ampicilina (10µg)	≥29		≤28
Ceftriaxona (30µg)	≥21	14-20	≤13
Ciprofloxacino (5µg)	≥21	16-20	≤15
Cefoxitina (30µg)	≥25		≤24
Gentamicina (10µg)	≥15	13-14	≤12
Vancomicina (30µg)	≥15		
Amoxicilina (10µg)	≥20		≤19
Imipenem (10µg)	≥16	14-15	≤13
Sulfametoxazol (23,75µg) – Trimetropim (1,25µg)	≥16	11-15	≤10

Fonte: Adaptado de ANVISA (2005).

Os resultados obtidos das análises são apresentados no tópico seguinte.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados das análises, estão dispostas na TAB. 2 abaixo, sendo possível observar que, a quase totalidade das amostras apresentou sensibilidade aos antimicrobianos, resultados este considerado bastante positivo no que concerne à qualidade do queijo artesanal produzido na Serra do Salitre.

Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar BHI

Amostras	Antimicrobiano									
	TET30	AMP10	CRO30	CIP5	CFO30	GEN10	VAN30	AMO10	IPM10	SUT25
ALA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
APA	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
AQ14A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AQ1A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LDA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LDT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PDA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
QD14A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
QD1A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
QD1T	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Legenda: R: resistente, M: Moderado e S: sensível. TET30: tetraciclina 30µg, AMP10: ampicilina 10µg, CRO30: ceftriaxona 30µg, CIP5: ciprofloxacina 5µg, CFO30: cefoxitina 30µg, GEN10: gentamicina 10µg, VAN30: vancomicina 30µg, IPM10: imipenem 10µg, AMO10: amoxicilina 10µg, SUT25: trimetropim 1,25µg e sulfametoxazol 23,75µg.

Das 10 amostras obtidas utilizando-se a metodologia preconizada para avaliação da susceptibilidade de antimicrobianos de *Staphylococcus* spp, somente na amostra APA, verificou-se resistência a dois antimicrobianos: Tetraciclina 30µg e Imipenem 10µg. Foi observada resistência também da amostra QD1T à Tetraciclina 30µg.

De modo geral as outras oito amostras de *Staphylococcus* spp. mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos utilizados. Resultado diferente foi verificado no estudo realizado por Ferreira (2015) no qual o objetivo foi caracterizar *S. aureus* isolados de queijo Minas frescal artesanal e industrializado, determinando também o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Neste trabalho, foram analisadas 56 amostras de

queijo Minas frescal de fabricação artesanal e dez de fabricação industrial, dos quais 29 isolados de *S. aureus* foram obtidos. Estes isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Treze isolados (44,8%) foram resistentes à penicilina (um beta lactâmico penicilínico como a ampicilina), três (10,3%) à tetraciclina, sendo dois (7,4%) resistentes a ambos. De acordo com o autor, a alta prevalência de *S. aureus* nas amostras de queijo Minas Frescal, alertam para a necessidade de reduzir os níveis de contaminação neste tipo de queijo através de monitoramento e controle da produção e comércio do produto. Felizmente, a resistência aos beta lactâmicos penicilínicos nas amostras analisadas no presente estudo foi inexistente, o que sugere que o processo de fabricação do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre atende à Boas Práticas de Fabricação.

O estudo realizado por Oliveira (2012) demonstrou que as 15 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas e identificadas por ela de queijo Minas artesanal apresentaram baixo percentual de resistência aos 20 antimicrobianos testados. As amostras analisadas apresentaram maior percentual de resistência à sulfonamida (100%). Alto percentual de resistência também foi observado à penicilina (80%), à ceftazidima (60%) e à oxacilina (40%). Em relação às demais drogas testadas, os percentuais de resistências encontrados foram abaixo de 30%. Ciprofloxacina, tetraciclina, ampicilina e amoxicilina revelaram 26,7% das amostras resistentes; cloranfenicol e sulfazotrim foram ineficazes em apenas 13,3% das amostras; as demais drogas (vancomicina, gentamicina, imipenem, ceftioxima, ceftriaxona e cefaclor) mostraram-se eficientes em 100% das amostras testadas. Nossos resultados vão de encontro aos de Oliveira (2012), tendo em vista que a droga a qual os microrganismos testados no presente trabalho mais apresentaram resistência foi a tetraciclina (20% das amostras testadas) e que esse é um percentual relativamente baixo e satisfatório, mostrando mais uma vez a qualidade do queijo Minas artesanal (no que diz respeito à susceptibilidade aos antimicrobianos).

Guimarães et al. (2012) em um estudo realizado tendo como objetivo verificar a susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. provenientes de queijos coalho comercializados na orla de Salvador (BA) foi avaliada pelo método de difusão. Para as amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo; tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO) e sulfametoxazol-trimetropim (SUT) foram eficazes; no entanto, verificou-se resistência à gentamicina (GEN). Os autores apontaram que, de acordo com os resultados

encontrados os antibióticos de uso comum em terapêutica humana e veterinária não foram eficazes contra os microrganismos testados, tornando essencial a adoção de medidas para controlar o uso indiscriminado na terapêutica humana e animal e, conseqüentemente, reduzir o aparecimento de resistência a antimicrobianos nos estafilococos presentes nos alimentos. Felizmente, nenhuma das amostras aqui avaliadas de *Staphylococcus* spp. apresentou resistência à gentamicina.

No estudo realizado por Evangelista-Barreto et al. (2016), objetivando analisar o perfil de resistência antimicrobiana entre os isolados bacterianos em queijos artesanais (n = 28) produzidos e comercializados em Cruz das Almas, Bahia; os resultados quanto à susceptibilidade antimicrobiana demonstraram multirresistência dos estafilococos coagulase positivo a tetraciclina (88,9%) e vancomicina (77,7%), indicando uma qualidade microbiológica dos queijos artesanais comercializados em Cruz das Almas insatisfatória para o consumo, além de veicular patógenos multirresistentes. Nosso trabalho também encontrou resistência à tetraciclina, porém, em proporções bem menores, o que indica, provavelmente, melhores cuidados na obtenção do queijo Minas artesanal quando comparados ao queijo de coalho.

Um trabalho realizado com o objetivo de demonstrar que o queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra atenderia aos padrões estabelecidos para coliformes totais e termotolerantes após sete dias de fabricação. Em relação à presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nem os queijos com 60 dias de maturação estariam adequados para o consumo humano. Isso pode estar diretamente relacionado à inoculação de *Staphylococcus* spp. na superfície do queijo pelos manipuladores visto que ele é virado todos os dias durante a maturação e os manipuladores não usam luvas para tal procedimento (BORELLI et al., 2006).

É importante ressaltar que, os queijos podem ser contaminados em várias etapas da produção. Durante a cura os queijos ficam expostos ao ambiente e grande parte das queijeiras ficam sujeitas a entrada de insetos e fluxo excessivo de pessoas que muitas vezes escolhem os queijos através do tato sem prévia higienização das mãos ou utilização de luvas, contribuindo assim para veiculação de microrganismos patogênicos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo realizado com amostras de estafilococos isolados de queijos provenientes da Serra do Salitre demonstraram índices satisfatórios de isolados bacterianos sensíveis a todos os antimicrobianos testados, já que apenas duas amostras se apresentaram resistentes a poucos tipos de antimicrobianos (20% para tetraciclina e 10% para imipenem). Considerando que o consumo de queijo é elevado em Minas Gerais, de modo particular, a sensibilidade das amostras aos antimicrobianos indicou que, no que diz respeito aos queijos amostrados neste trabalho, há uma qualidade microbiológica satisfatória, considerando que os consumidores destes queijos provavelmente não serão expostos a certos microrganismos com multirresistência a antimicrobianos, o que é um grande problema da saúde pública atual.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA – DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017.** Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/bem-estar-animal/arquivos/arquivos-legislacao/decreto-30691-de-1952.pdf>. Acesso em: 18 abril 2017.
- BORELLI, B. M., LACERDA, I. C. A., FERREIRA, E. G., DIAS, R. S., CARMO, L. S. do, SANTOS, D. A., ROSA, C. A. Enteroxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, 2006.
- CORBIA, A. C. G; NASCIMENTO, M. da G. F. do; OLIVEIRA, C. Z. F. de; NASCIMENTO, E. R. do ***Staphylococcus aureus*: importância para a saúde pública e aspectos epidemiológicos.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 15 p.
- COSTA, J. C. B. **Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus spp.* isolados de queijo Minas frescal.** 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2010b.
- DIASI, G; ARAÚJO, E, A; GOMIDE, J; MAGALHÃES, M, A; FURTADO, M, M. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias da produção de queijo Minas Artesanal fabricado em Sabinópolis-MG.** II Congresso brasileiro de qualidade de leite, realizado em Goiânia no período de 23 a 25 de outubro de 2006.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. 4 ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.
- EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.** v.10, n.1, p. 55 – 67. 2016.
- FERREIRA, Mariana de Andrade. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de Queijo Minas Frescal Industrial e Artesanal.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.
- GOMES, H. DE A.; GALLO, G. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas, a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas v.15, n.2, p.158-161, 1995.
- GUIMARÃES, A.G. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.),** São Paulo, v. 71, n. 2, 2012.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios**. 2005. 61 p. Tese (mestrado em Engenharia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

Manual de Segurança alimentar de queijos tradicionais. Disponível em: <www.esac.pt/noronha/manuais/segurancaalimentar_queijos.pdf> Acesso em: 29 mai. 2017.

MURRAY, Patrick R. et al. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1998. 762 p.

NASCIMENTO, M. da G. F. do; NASCIMENTO, E. R. do. **Importância da avaliação microbiológica na qualidade e segurança dos alimentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 11 p.

OLIVEIRA, D. L. S. **Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista in vitro frente a Lactobacillus spp.** Dissertação. 2012. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos**. Disponível em: <<http://www.infoleche.com/DERIVADO/quesos/quesosmanual.html>> Acesso em: 22 mai. 2017.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Belo Horizonte, **Química nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTO, M. S., FERREIRA, C. L. F. F., MARTINS, J. M., TEODORO, V. A. M., PIRES, A. C. S. P., FONTES, L. B. A., VARGAS, P.I. R. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de Boas Práticas de Fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, p.342-347, 2009.

RUTHES, L.D.; GOULARTE, M.M.M. Qualidade microbiológica de queijos de diversas regiões do Estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, v.27, n.218/219, p.172-176, 2013.

SILVA, J. G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 198 p. Tese (mestrado). UFLA, Lavras - MG.

TRONCO, VANIA MARIA. **Manual de inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192 p. il.

