

PESQUISA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* E *ESCHERICHIA COLI* EM QUEIJO DO TIPO “COALHO” COMERCIALIZADO EM SALVADOR (BA). IMPORTÂNCIA PARA A SAÚDE PÚBLICA

► Resumo

A maioria dos queijos tipo “coalho”, distribuídos no comércio varejista de Salvador é proveniente de leite não pasteurizado e produzido de forma caseira e artesanal. Em consequência, esses queijos podem se constituir em veículo de contaminação por vários microrganismos, dentre eles a *Listeria monocytogenes* e a *Escherichia coli*, bactérias amplamente disseminadas na natureza e consideradas como agente etiológico das toxinfecções alimentares, sendo a *Listeria monocytogenes* particularmente perigosa para gestantes, crianças, idosos e indivíduos com comprometimento imunológico. O presente trabalho teve como objetivo, pesquisar a presença de *Listeria monocytogenes* pelo método FDA (1) e *Escherichia coli*, pelo método dos tubos múltiplos, segundo (2). Foram analisadas 32 amostras de queijo tipo “Coalho” comercializado na cidade de Salvador (BA) – Brasil, com e sem o registro do Serviço de Inspeção Federal (SIF), sendo que a *Listeria monocytogenes* foi pesquisada em apenas 17 delas. A *Listeria monocytogenes* foi identificada em uma das amostras analisadas, sendo esta sem o registro do SIF, e a *E.coli*, em 28 – (95,5 %) do total de amostras. A presença desse microrganismo indica perigo à saúde do consumidor, uma vez que a legislação vigente do país (3), exige a ausência em 25g do alimento, enquanto para a *E.coli*, sua presença vai indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, fazendo-se necessário a implantação de um programa de Boas Práticas de Fabricação nas empresas produtoras desses queijos.

Palavras-chave: Queijo coalho, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*

► Summary

Listeria monocytogenes and *Escherichia coli* in curdle cheese commercialized in the city of Salvador (BA) – Brazil. Importance for the public health.

The curdle cheese distributed in the retail stores in Salvador (BA) is proceeding from no pasteurized milk and is homemade produced. In consequence, these cheeses can consist in contamination vehicle of some microorganisms, amongst them *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* widely distributed in nature and considered as etiologic agent of food-borne illness, being particularly dangerous for pregnant women, children, elderly and immunocompromised people. The aim of this research was to investigate the presence of *L. monocytogenes* for the method (FDA) (1) and *E. coli* by the method of the multiple tubes, according to the (2). Thity-two samples of curdle cheese with and without register of the Service of Federal Inspection (SIF), commercialized in the city of Salvador was analyzed, being that *L. monocytogenes* was searched in 17 of them, and identified in one of the analyzed samples and *E. coli* was detected in 95,5% of the total of the samples. The presence of *L. monocytogenes* indicates hazard to the health of the consumers, once the current law (3), demands the absence of this microorganism in 25g of the food, however, for the *E. coli*, its presence indicate unsatisfactory food sanitary quality, becoming necessary the implantation of a program of good manufacture practices in theses food industry.

Keywords: Curdle cheese, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*

*Clícia Capibaribe Leite
Aláise Gil Guimarães
Natália Souza Ribeiro
Matilde Dantas da Silva
Patrícia Nascimento Assis

Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Farmácia

*Autor para correspondência:
Av. Barão de Jeremoabo, s/n
Campus Universitário de Ondina
Cep: 40170-115. Salvador. BA
Fone: (71) 332-2571
E-mail: clicia@ufba.br

Introdução

No Brasil, principalmente na Região Nordeste, o queijo de coalho é muito apreciado. A maioria desses queijos tem sua origem ligada à fabricação artesanal, em numerosas unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte, tornando difícil sua quantificação em estatísticas oficiais e, portanto, o controle pelos órgãos de inspeção.

O leite utilizado para sua elaboração, normalmente não recebe o beneficiamento térmico, o que impõe sério perigo quanto à contaminação por uma grande variedade de microrganismos. Além disso, essas queijarias utilizam o estômago de animais como coalho, devido à presença da enzima renina contida nesse material, comprometendo ainda mais a qualidade destes produtos (4,5).

Em pesquisa realizada em três regiões do estado do Ceará, Nordeste do Brasil, foi observado que 85% dos produtores utilizavam o leite sem pasteurização, sendo que as unidades que o submetiam a este tratamento térmico eram geralmente aquelas que possuíam inspeção federal. Quanto ao tipo de coalho, verificaram uma variação de acordo com a região. Em determinada região, 85% dos produtores utilizavam o coalho industrial na forma de pó ou líquido. Enquanto em outra região, 50% dos produtores utilizavam o estômago de animais (6).

Devido à precariedade com que este alimento é produzido e sua riqueza em nutrientes, torna-se um potente veículo de contaminantes, dentre os quais pode-se citar a *Listeria monocytogenes* e o do grupo dos coliformes, que se constituem em importantes indicadores do aspecto higiênico-sanitário, pois a detecção desses microrganismos e de seu principal representante, a *E. coli*, que possui sorogrupos de patogenicidade conhecida em alimento, caracteriza condições higiênicas insatisfatórias, podendo expor o consumidor à enfermidades de origem alimentar (7).

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno de presença ubiqüitária, sendo reconhecida como agente da listeriose humana desde 1929. Entretanto, somente a partir da década de 80, devido à ocorrência de surtos de listeriose nos EUA, Canadá, Nova Zelândia e Suíça é que esta foi considerada como um microorganismo passível de transmissão através dos alimentos. A literatura mostra que a maioria dos surtos ocasionais e epidêmicos de listeriose humana tem sido associada ao consumo de alimentos refrigerados, principalmente derivados do leite, sobremesas e vegetais (8,9,10).

Estes surtos chamaram a atenção das autoridades de saúde pública e da indústria alimentícia, devido à gravidade da infecção provocada por este patógeno, como septicemia, encefalite, meningite e aborto espontâneo, apresentando altos índices de mortalidade. Embora qualquer pessoa esteja sujeita à infecção por este microrganismo, ele se apresenta particularmente perigoso entre gestantes, neonatos, bebês, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido (11).

A *Listeria monocytogenes* apresenta algumas particularidades em relação a sua capacidade e resistência de multiplicação que a torna ainda mais perigosa à saúde. Ela é capaz de crescer

em uma temperatura que varia de 3° a 45°C, apresentando uma faixa ótima entre 30°C e 37°C. É também resistente a uma ampla faixa de pH, 5,0 a 9,6 (12, 8).

Como a dose infectante deste microrganismo é ainda desconhecida, alguns países como os EUA e o Brasil adotaram a ausência de *Listeria monocytogenes* padrão de tolerância em alimentos prontos para consumo (13).

Este trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em queijo do tipo "coalho" comercializado na cidade de Salvador (BA) – Brasil.

Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no período de dezembro de 2001 a junho de 2002, quando foram colhidas 32 amostras de Queijo de Coalho comercializadas em diferentes pontos comerciais, tais como supermercados, lojas de produto do interior e vendedores ambulantes na cidade de Salvador (BA). Destas amostras, 12 apresentavam o Registro de Inspeção Federal – SIF, do Ministério de Agricultura e 20 não o possuíam.

As amostras foram analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, das quais, 32 foram submetidas à determinação de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, através da técnica do Número Mais Provável (NMP) em tubos múltiplos (2) e confirmação da presença de *E. coli* e 17, à pesquisa de *Listeria monocytogenes*, utilizando-se a metodologia do FDA (1).

1 - Determinação de Coliformes: Na determinação de coliformes foram realizados os testes presuntivo e confirmativo para coliformes totais (a 35°C) e coliformes fecais (a 45°C).

a) Teste Presuntivo: Para inoculação do teste presuntivo, selecionou-se três diluições adequadas da amostra e transferiu-se 1,0 mL de cada diluição para uma série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLST). Incubou-se em estufa bacteriológica à 35°C, durante 48 horas e observou-se a produção ou não de gás.

b) Teste Confirmativo para Coliformes Totais: Dos tubos positivos, com produção de gás do CLST, transferiu-se, através de alça de platina, uma alçada para tubos contendo Caldo Lactose Bile Verde Brilhante. Incubou-se em estufa bacteriológica a 35°C, durante 48 horas e observou-se a produção ou não de gás.

c) Teste Confirmativo para Coliformes Fecais: Dos tubos positivos, com produção de gás do CLST, transferiu-se através de alça de platina, uma alçada para tubos contendo Caldo EC, incubou-se em banho-maria, a 45°C, durante 24 horas e observou-se a produção de gás.

Os resultados foram observados em tabela de NMP.

2 - Confirmação da *Escherichia coli*: De cada tubo positivo no

Caldo EC, estriou-se uma alçada da cultura em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubou-se em estufa bacteriológica a 35°C durante 24 horas e observou-se o crescimento de colônias típicas de *E.coli*. De cada placa foram escolhidas duas colônias típicas para purificação, que foram transferidas para tubos contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas e, a partir das culturas purificadas em PCA, efetuou-se a Coloração de Gram e as provas bioquímicas de Indol, Citrato, Vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

3 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

a) Enriquecimento seletivo com Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB), com incubação em estufa bacteriológica a 30°C, por 24 horas.

b) Plaqueamento seletivo diferencial em:

* Ágar Oxford (OXA), incubação 35°C por 24-48 horas;

* Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM) adicionado de Esculina e Citrato Férrico Amoniacal, incubação a 30°C, por 24-48 horas.

c) Confirmação das colônias típicas: Foram selecionadas colônias típicas e semeadas em Ágar Trypticase Soja, suplementado com extrato de levedura (TSA-YE) para purificação e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C, por 24-48 horas. A partir das culturas purificadas, foram realizadas as provas bioquímicas de testes de catalase, motilidade, nitrato, reação em Ágar TSI, verificação de hemólise, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e esculina).

Os resultados foram dados como presença ou ausência de *Listeria monocytogenes*.

Resultados e Discussão

Observa-se na Tabela 1, que ocorreu uma elevada contaminação por coliformes totais (35°C), coliformes fecais (45°C) e

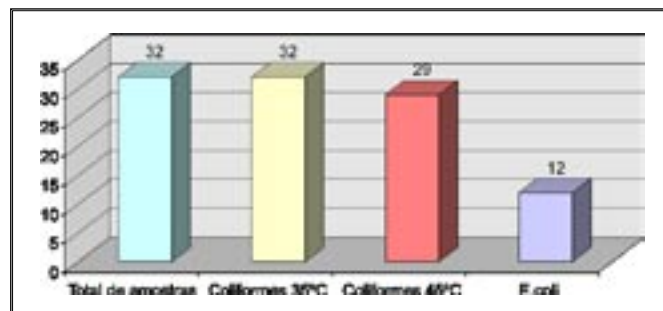


Figura 1. Quantidade de amostras com valores superiores a 500NMP/g para coliformes a 35°, a 45°C e *E.coli*.

E.coli, não havendo diferença significativa de resultados entre as amostras que possuíam SIF e aquelas que não o possuíam, caracterizando uma falha nas ações do Serviço de Inspeção Federal.

Em relação aos coliformes a 45°C, 29 amostras (90,62%) encontravam-se em condições impróprias para consumo, por apresentarem valores acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente (3), que determina, no máximo, 500 NMP/g de coliformes, dos quais 12 amostras (37,5%) foram identificadas como *E.coli*. Quanto aos coliformes a 35°C, não existem limites estabelecidos, mas foi verificado que 100% das amostras apresentavam-se com valores superiores a 500 NMP/g (figura 1).

Resultados semelhantes para coliformes fecais em queijo tipo coalho foram encontrados em pesquisa realizada, no Estado da Paraíba, cujo valor médio foi de $2,6 \times 10^4$ NMP/g (4). Entretanto, (14), pesquisando coliformes totais e fecais em 18 amostras de queijo tipo coalho no mesmo estado, encontraram valores médios superiores a 10^3 NMP/g.

Avaliando a qualidade microbiológica de queijo de coalho comercializado em Recife (PE), (15) observaram que a maioria das amostras apresentava alta contaminação por coliformes.

Em relação à *Listeria monocytogenes*, constatou-se sua presença em apenas uma das 17 amostras analisadas. Quanto

Tabela 1: Resultados de coliformes a 35°C, coliformes a 35°C *E. coli*, de queijos do tipo "coalho", com e sem o Registro no Serviço de Inspeção Federal - SIF do Ministério da Agricultura.

Valores	Registro	Coliformes a 35°C (NMP/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Valor Mínimo	Com SIF	40	40	< 30
	Sem SIF	$\geq 2,4 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^4$	< 30
Valor Médio	Com SIF	$1,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$5,7 \times 10^2$
	Sem SIF	$\geq 2,4 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^4$	$9,1 \times 10^2$
Valor Máximo	Com SIF	$\geq 2,4 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
	Sem SIF	$\geq 2,4 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^4$

aos resultados obtidos para este microorganismo por alguns pesquisadores em diferentes tipos de queijo, observou-se uma discordância de resultados. No Estado do Rio de Janeiro, não foi evidenciada a presença desta bactéria em 58 amostras de queijo tipo Minas Frescal (16).

Contudo, pesquisando *L. monocytogenes* em 103 amostras de diferentes tipos de queijo, também na cidade do Rio de Janeiro, foi verificada a presença deste microrganismo em 11 das amostras (17). Valores próximos foram encontrados por outros autores, que verificaram a incidência deste patógeno em torno de 10% das amostras de queijo Minas Frescal comercializados na cidade de São Paulo (9).

Pode-se supor, que esta variação nos resultados obtidos por diferentes pesquisadores, deva-se, provavelmente, aos diferentes métodos empregados nas pesquisas deste microrganismo, assim como nas diferenças nas técnicas de produção existentes para os vários tipos de queijo analisados (17).

Conclusões

O fato de 90,62% das amostras apresentarem coliformes fecais acima do permitido pela legislação vigente no país e a presença de *Listeria monocytogenes*, mesmo em apenas uma das amostras, evidencia que o queijo de coalho comercializado na cidade de Salvador (BA) não apresenta condições higiênico-sanitárias satisfatórias, mostrando falhas no processamento, além de expor o consumidor a risco de contrair problemas de gastroenterites ou mesmo listeriose, principalmente as mulheres grávidas, as crianças, os idosos e os indivíduos com sistema imunológico comprometido.

É importante ressaltar que, mesmo as amostras que possuíam o nº de registro no SIF, apresentaram NMP de coliformes a 45 °C e *E.coli*, acima do permitido pela legislação, mostrando que o registro não garantiu a sua qualidade sanitária, indicando a necessidade de uma fiscalização mais rigorosa durante o processamento desses queijos.

Referências

1. Hitchins AD. *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*, 7ed. Estados Unidos: Food And Drug Administration, 1992, cap.10, p.141-151.
2. Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992, 1919p.
3. Brasil, Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução – RDC Nº 12, Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos*, 02 de janeiro de 2001, Brasília-DF.
4. Florentino ER, Martins RS. *Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no Estado da Paraíba*. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n. 59, p. 43-48, 1999.
5. Aquino FT. *Produção de queijo de coalho na Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento*. *Dissertação de mestrado-centro de tecnologia*. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983. 88p.
6. Nassu RT, Lima JR, Bastos RSM, Macedo AB, Lima PHM. *Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará*. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n. 89, p. 28-36, 2001.
7. Nascimento MGF, Nascimento RE, Cunha CP, Corbia GCA. *Estudo transversal sobre alguns fatores de risco na contaminação natural de coliformes fecais em queijo minas frescal*. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 86, p. 55-59, 2001.
8. Loguércio AP, Silvia WP, Aleixo JAG, Costa MM, Vargas AC. *DE. Listeria monocytogenes: um importante patógeno de origem alimentar*. *Revista Higiene Alimentar*, v.15, n. 80/81, p.39-48, 2001.
9. Destro MT, Serrano AM, Kabuki DY. *Isolation of Listeria species from some Brazilian meat and dairy products*. *Food Control*, v.2, p.110-112, 1991.
10. Almeida PF, Almeida, RCC, Rodrick GE. *Listeria monocytogenes: importância e distribuição nos alimentos*. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n. 64, p.19-23, 1999.
11. Bell C, Kyriakides A. *LISTERIA una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. Ed. ACRIBA, 188p.,1998.
12. Donnelly CW, et al. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3ed.,1992.
13. Da Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela. São Paulo, 133-139p, 1997.
14. Leite Júnior AFS, Florentino ER, De Oliveira EB, Torranó ADM. *Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB*. *Revista Higiene Alimentar*, v.14, n. 73, p.53-59, 2000.
15. Mendes ES, Lima EC, Numeriani AKM, Coelho MIS. *Staphylococcus aureus, Salmonella sp. e coliformes em queijo de “coalho” comercializado em Recife*. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n. 66/67, p.122-126, 1999.
16. Corbia ACG, Nascimento MGF, Nascimento ER, Lignon GB. *Pesquisa de Listeria monocytogenes e contagem total em placa de mesófilos no queijo tipo minas frescal*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.23, n. 2, P. 72-75, 2001.
17. Silva MCD, Vilardi TCC, Tibana A. *Avaliação de métodos para a detecção de Listeria em queijos*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v.2, n.18, p.150-155, 1998.