

Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana do leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia

Microbiological quality and antimicrobial susceptibility of informally traded milk in Cruz das Almas county, Bahia

Norma Suely Evangelista Barreto^{1*}; Gleyde Córdova da França Santos²; Aura Lacerda Crepaldi³; Rebeca Ayala Rosa dos Santos⁴

Resumo

Para a avaliação da qualidade microbiológica do leite *in natura*, bem como a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas, foram analisados 25 estabelecimentos comerciais em Cruz das Almas, Ba. Para isso realizou-se a quantificação de micro-organismos heterotróficos mesófilos e psicrotróficos aeróbios, bolores e leveduras, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes (35°C e 45°C) e presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. A contagem média de micro-organismos heterotróficos mesófilos foi de $1,6 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, psicrotróficos $9,6 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, bolores e leveduras $3,8 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, coliformes a 35°C 4×10^5 NMP.mL⁻¹ e a 45°C $3,8 \times 10^5$ NMP.mL⁻¹. *Staphylococcus* coagulase positiva foi observada em 44% das amostras, com média de $7,3 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e diferença estatística ($P>0,05$) entre os estabelecimentos. *Escherichia coli* foi isolada em 76% das amostras, e a presença de *Salmonella* não foi observada em nenhuma das amostras. *Escherichia coli* apresentou resistência à tetraciclina (57,9%), ampicilina e cloranfenicol (10,5%) e cefalotina (5,3%), enquanto as estirpes de *Staphylococcus* coagulase positivo foram resistentes a amicacina (18%) e vancomicina (18%). O leite *in natura*, além de apresentar qualidade microbiológica insatisfatória, colocando em risco a saúde dos consumidores, pode servir de veículo de disseminação de bactérias resistentes a diferentes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, toxiinfecção alimentar, patógenos, segurança alimentar

Abstract

The microbiological quality as well as the antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from raw milk obtained from 25 food stores in Cruz das Almas, Bahia were evaluated. The analysis included counts of mesophilic and psicrotrophic microorganisms, molds and yeast, *Staphylococcus* spp., coagulase-positive *Staphylococcus*, coliforms (at 35°C and 45°C), and the presence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. The average count for mesophilic and psicrotrophic microorganisms, molds and yeast, and coliforms at 35°C and 45°C were 1.6×10^9 CFU.mL⁻¹, 9.6×10^4 CFU.mL⁻¹, 3.8×10^8 CFU.mL⁻¹, 4.0×10^5 MPN.mL⁻¹ and 3.8×10^5 MPN.mL⁻¹, respectively. Coagulase positive *Staphylococcus* was found in 44% of the samples (mean value of 7.3×10^5 CFU.mL⁻¹), and *E. coli* was present in 76% of them. *Salmonella* was not detected in any of the samples tested. *E. coli* showed resistance (57.9%) to tetracycline, to ampicillin and chloramphenicol (10.5%), and cephalotin (5.3%), while coagulase-

¹ Prof^a. Pesquisadora do Programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, BA. E-mail: nsevelista@ufrb.edu.br

² Discente do Programa de Mestrado em Microbiologia Agrícola, UFRB, Cruz das Almas, BA. E-mail: gleydecordova@hotmail.com

³ Discente do curso de Engenharia de Pesca, UFRB, Cruz das Almas, BA. E-mail: a_crepaldi@hotmail.com

⁴ Discente do curso de Ciências Biológicas, UFRB, Cruz das Almas, BA. E-mail: rebeca_rosa@yahoo.com.br

* Autor para correspondência

positive *Staphylococcus* strains were resistant to ampicillin (18%) and vancomycin (18%). The raw milk besides to present poor microbiological quality, becoming a health risk of the consumers, it may contribute to the dissemination of resistant bacteria to various antimicrobial agents.

Key words: *Escherichia coli*, food poisoning, pathogens, food security

Introdução

Em 2011, o Brasil produziu 32,1 bilhões de litros de leite fluido, sendo que aproximadamente, 33% deste volume tratou-se de leite não inspecionado (EMBRAPA, 2012). O destino do leite sem inspeção é o mercado informal, podendo ser vendido diretamente ao consumidor ou ser comercializado na forma de derivados produzidos por pequenos laticínios (MACIEL et al., 2008).

A baixa qualidade microbiológica encontrada no leite *in natura* produzido no Brasil é reflexo das precárias condições de higiene típicas da produção nacional. Embora importantes para a economia do país, as fazendas leiteiras ainda apresentam pouco ou nenhum conhecimento tecnológico, com condições higiênicas insatisfatórias e controle sanitário ineficiente (ARCURI et al., 2006; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

O consumo de leite sem tratamento prévio, como a pasteurização, expõe a população a diversas doenças como a tuberculose e a brucelose (GERMANO; GERMANO, 2008), além de não assegurar a distribuição de um produto inócuo. Para ser considerado de qualidade, o leite precisa ter qualidade sensorial, nutricional e físico-química, bem como contagem reduzida de células somáticas e baixa carga microbiana (ZOCHE et al., 2002). Por outro lado, outro problema enfrentado com o consumo de leite diz respeito à presença de resíduos de antibióticos, pois além de desencadear fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis promove alterações no equilíbrio da flora intestinal e a seleção de bactérias resistentes no trato digestório dos consumidores, possibilitando o surgimento de multiressistência aos antimicrobianos pelos micro-organismos, dificultando o tratamento de doenças consideradas comuns (ALMEIDA et al., 2003).

Entre os indicadores mais utilizados para a qualidade higiênica sanitária dos alimentos, destacam-se o grupo dos coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os coliformes são indicadores de contaminação fecal e do risco da presença de micro-organismos patogênicos, como a *Salmonella*. Os estafilococos são de grande importância, principalmente os coagulase-positiva, pois podem produzir enterotoxinas termoestáveis, atingindo o consumidor mesmo após o processo de pasteurização (MACIEL et al., 2008). A contagem de micro-organismos mesófilos é contemplada na legislação brasileira para leite *in natura* (BRASIL, 2011). Entretanto, muitas dessas normas não são seguidas, e uma das principais justificativas para a quantificação desse grupo de bactérias é que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Apesar da comercialização do leite *in natura* ser considerada proibida pelos órgãos federais, em Cruz das Almas (BA) sabe-se que alguns estabelecimentos ainda comercializam esse alimento em virtude da elevada procura. Este fato se deve a crença popular de que esse leite é mais rico em nutrientes. Por outro lado, o baixo custo estimula seu consumo principalmente pela população de baixa renda. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica do leite *in natura* comercializado no município de Cruz das Almas, Bahia, visando verificar as características sanitárias do produto, bem como a suscetibilidade das estirpes isoladas a diferentes agentes antimicrobianos comerciais.

Material e Métodos

No período de abril a setembro de 2010 foram analisados 25 estabelecimentos que comercializavam

leite *in natura* em Cruz das Almas, Bahia. Os estabelecimentos foram divididos de acordo com a sua atividade comercial (04 açougues, 08 padarias, 08 mini-mercados e 05 supermercados). As amostras de leite foram adquiridas em volume de 1 L e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, no Núcleo de Estudos em Pesca e Aqüicultura (NEPA) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) para a quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas e psicrotóticas aeróbias, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e a 45°C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella*.

Para a contagem das bactérias heterotróficas mesófilas e psicrotóticas aeróbias, adicionou-se uma alíquota de 25 mL da amostra em 225 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, homogeneizada e, a partir desta, realizadas diluições seriadas até 10⁻⁵. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram semeadas em duplicata em placas de Petri, contendo o meio Plate Count Agar (PCA) usando a técnica de *pour plate* para as bactérias heterotróficas mesófilas e de *spread plate* para os psicrotóticos. As placas foram incubadas a 35°C/24-48 h para os mesófilos e a 7°C por até 10 dias para os psicrotóticos. Na contagem de bolores e leveduras, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas na superfície do meio Ágar Sabouraud Dextrose a 4% suplementado com cloranfenicol e incubado a 25°C±1 por cinco a sete dias (SILVA et al., 2007).

A determinação de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada usando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos (Número Mais Provável – NMP. mL⁻¹). Inicialmente alíquotas de 1 mL da amostra foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLS) contendo tubos de Durhan invertidos e incubados a 35°C/48 h. Os tubos que apresentaram turvação do meio e formação de gás nos tubos de Durhan uma nova alíquota foi transferida para tubos contendo Caldo Lactose Bile Verde Brilhante (CBVB) e caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados respectivamente, a 35°C/48 h e a 45°C/24 h, em

banho-maria. Decorrido esse período, os tubos EC positivos foram semeados no meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35°C/24 h. As colônias características de *E. coli* foram isoladas em tubos de ensaio contendo Agar Triptose Soja (TSA) e submetidas aos testes bioquímicos do IMViC (indol, vermelho de metila, voges-proskauer e citrato de Simmons) (SILVA et al., 2007).

A contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada por *spread plate* usando alça de Drigalski. Inoculou-se 0,1 mL da amostra em Agar Baird-Parker, em duplicata, e incubou-se a 35°C/ 48 h. Em seguida, foi realizada a contagem do número de colônias que apresentavam características típicas, ou seja, colônias negras, circulares, brilhantes, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas e rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente. O número de colônias contadas foi multiplicado pelo fator 10 e a diluição correspondente. As colônias características de *Staphylococcus* foram submetidas aos testes de catalase e coagulase (SILVA et al., 2007).

Para a pesquisa de *Salmonella*, inicialmente realizou-se o pré enriquecimento adicionando 25 mL da amostra em 225 mL de Caldo Lactose (CL) e incubado a 35°C/24 h. Em seguida, alíquotas de 1 mL e 0,1 mL foram inoculadas em 10 mL de caldo Tetrionato (TT) e caldo Rappaport (RV), respectivamente e incubados a 37°C/24 h e 42°C/24 h, em banho-maria. Posteriormente alíquotas foram retiradas e estriadas nos meios seletivos Agar MacConkey (colônias incolores ou translúcidas levemente amareladas) Agar *Salmonella-Shigella* (colônias com ou sem centro negro) e Agar Verde Brilhante (colônias róseas a vermelhas) e incubadas a 35°C/24 h. As colônias com morfologia característica de *Salmonella* foram inoculadas em Agar Ferro Açúcar Triplo (TSI) e Agar Lisina Ferro (LIA) e incubados a 35°C/24 h. A partir do crescimento positivo (ácido na base e alcalino no ápice para Agar TSI e alcalino com ou sem produção de gás para LIA) uma nova alíquota foi retirada e semeada em Agar Tripitona Soja (TSA),

para posterior identificação bioquímica (urease, indol, fermentação de dulcitol, sacarose e lactose, vermelho de metila (VM), voges-proskauer (VP), utilização do citrato e descarboxilação da lisina) e teste sorológico (SILVA et al., 2007).

Para o teste de antibiograma o método utilizado seguiu as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2005). Para o teste foram usadas 19 cepas de *E. coli* e 11 de *Staphylococcus coagulase positiva*. Para a padronização do inóculo, mediu-se a densidade óptica da cultura, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, com base na escala de MacFarland a 0,5 ($10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹). Após o ajuste do inóculo, mergulhava-se um *swab* de algodão estéril na salina turva, pressionando-o firmemente contra a parede interna do tubo a fim de ser retirado o excesso e semeados em placas contendo Agar Muller-Hinton. Em seguida, os discos dos antimicrobianos foram depositados nas placas e estas, incubadas a 37°C/18 h. A medição dos halos de inibição foram medidos em milímetros com o uso de paquímetro digital. Para os testes de sensibilidade foram selecionados 12 antimicrobianos comerciais: ácido nalidíxico – NAL (30 µg), ampicilina – AMP (10 µg), ceftazidime – CFZ (30 µg), cloranfenicol – CLO (30 µg), gentamicina – GEN (100 µg), imipenem – IPM (10 µg), sulfazotrin – SUT (25 µg), tetraciclina – TET (30 µg), nitrofurantoina – NIT (300 µg), amicacina – AMI (30 µg), cefalotina – CFL (30 µg), ciprofloxacino – CIP (5 µg) e vancomicina – VAN (30 µg). Como controle utilizou-se uma cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A presença ou ausência de plasmídios-R foi testada para as estirpes que apresentaram perfil de multi-resistência aos antimicrobianos testados. Como agente de cura foi utilizado o Acridine Orange (AO) na concentração de 100 µg/mL. As cepas foram crescidas em caldo Luria-Bertani (LB) + AO e incubadas a 30°C/24 h. Após esse período realizou-se novamente o antibiograma a fim de verificar se houve alteração no perfil de resistência

aos antimicrobianos previamente testados (MOLINA-AJA et al., 2002).

O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana) foi utilizado para determinação da múltipla resistência dos micro-organismos. Este índice é definido como a/b, ou seja, o número de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente (a), dividido pelo número de antimicrobianos aos quais o isolado foi exposto (b), multiplicando-se o valor final por 100 para obtenção dos resultados em percentual (HIRSCH et al., 2006).

Delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi usado utilizando os estabelecimentos como tratamento e as amostragens como repetição, sendo o estabelecimento 01 (açougues), 02 (padarias), 03 (mini-mercados) e 04 (supermercados). Os resultados foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) por meio do programa Sisvar 5.1. Utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Foi observada elevada contagem microbiana em todas as amostras analisadas, independente do estabelecimento obtido. Apesar dos açougues apresentarem as piores condições higiênicas, situação observada visualmente durante a obtenção das amostras, o leite não apresentou as maiores contaminações. A contagem de bactérias heterotróficas mesófilas variou de $9,1 \times 10^5$ a $8,8 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹. Apesar dos micro-organismos mesófilos nas amostras provenientes dos supermercados terem apresentado maior contaminação, não houve diferença significativa entre os estabelecimentos ($p < 0,05$) (Tabela 1). Todas as amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) que limita valores de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ para leite cru refrigerado tipo A integral. O grupo de micro-organismos heterotróficos mesófilos inclui a maioria das bactérias acidificantes do leite e os patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Melo et al. (2010) relataram contagens de

1,8 x 10⁵ a 2,2 x 10⁶ UFC.ml⁻¹ no leite *in natura* comercializado no município de Major Isidoro, Alagoas. Alves et al. (2009) encontraram contagens de mesófilos na faixa 10⁵ a 10⁷ UFC.mL⁻¹ no leite comercializado informalmente na cidade de São Luís-MA, enquanto Schedler et al. (2009) relataram contagens de 3,90 x10⁶ UFC.mL⁻¹ em diferentes

propriedades do oeste paranaense. Santana et al. (2001) relataram redução nos valores de mesófilos e psicrotróficos de 86% e 96% respectivamente, após a higienização dos tetos, demonstrando que grande porcentagem de micro-organismos dos tetos dos animais são incorporados no leite.

Tabela 1. Valores médios das contagens microbianas no leite *in natura* obtido em diferentes estabelecimentos em Cruz das Almas, Bahia, durante o período de abril a setembro de 2010.

Estabelecimentos (número)	Contagem microbiana UFC.mL ⁻¹ ou NMP.mL ⁻¹					
	Mesófilos	Psicrotróficos	Bolores e Leveduras	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
01 (n = 4)	9,5 x 10 ⁷ a	1,5 x 10 ³ a	1,5 x 10 ⁷ a	1,3 x 10 ⁴ b	2,8 x 10 ⁵ a	2,9 x 10 ⁶ a
02 (n = 8)	1,8 x 10 ⁹ a	2,6 x 10 ⁵ a	9,4 x 10 ⁸ a	8,6 x 10 ⁵ a	1,0x 10 ⁶ a	5,9 x 10 ⁴ b
03 (n = 8)	1,6 x 10 ⁹ a	3,8 x 10 ⁴ a	1,1 x 10 ⁸ a	2,4 x 10 ⁵ ab	2,0 x 10 ⁴ a	3,9 x 10 ³ b
04 (n = 5)	2,9 x 10 ⁹ a	8,7 x 10 ⁴ a	4,7 x 10 ⁸ a	4,9 x 10 ⁵ ab	1,9 x 10 ⁵ a	4,7 x 10 ³ b

Obs: Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05). Estabelecimentos 01 – açougue; 02 – padaria; 03 – mini-mercados e 04 – supermercados.

UFC = Unidades Formadoras de Colônias. NMP = Número Mais Provável.

Fonte: Elaboração dos autores.

A presença de bactérias psicrotróficas foi observada em 80% das amostras de leite, com contagens variando de 9,5 x 10² a 1,5 x 10⁶ UFC.mL⁻¹. As amostras obtidas nas padarias apresentaram maior média microbiana (2,6 x 10⁵ UFC.mL⁻¹), embora sem diferença significativa (p<0,05) (Tabela 1). A maior problemática quando se tem elevada carga microbiana no leite é que a atividade enzimática a partir de 1,0x 10⁴ UFC.mL⁻¹ já é suficiente para comprometer as características do alimento, encurtando a sua vida útil (ZOCHE et al., 2002).

A presença de bolores e leveduras nas amostras de leite variaram de 1,1 x 10⁴ a 3,3 x 10⁹ UFC.mL⁻¹, sendo a maior contaminação observada nas amostras provenientes das padarias (9,4 x 10⁸ UFC.mL⁻¹) (Tabela 1), embora sem diferença significativa (P<0,05) entre os estabelecimentos. Torkar e Vengust (2008), avaliando 60 amostras de leite *in natura* detectaram bolores e leveduras,

respectivamente, em 95% e 63,3% das amostras. Apesar de não haver padrões microbiológicos na legislação brasileira para estes micro-organismos, a sua presença no leite representa riscos à saúde pública em virtude de algumas linhagens de fungos serem patogênicas ao homem.

A quantificação de coliformes a 35°C variou de 9,3 x 10² a >1,1 x 10⁶ NMP.mL⁻¹ e a 45°C de 1,5 x 10¹ a >1,1 x 10⁷ NMP.mL⁻¹. Por estabelecimento, as amostras provenientes das padarias, foram estatisticamente significativas (P>0,05) em relação aos demais estabelecimentos (Tabela 1). Para os coliformes a 45°C, houve variação de 2,0 x 10⁴ a 1,0 x 10⁶ NMP.mL⁻¹, sem diferença significativa entre os estabelecimentos, embora o leite comercializado nas padarias tenha sido o mais contaminado (Tabela 1). A presença de coliformes acima de 10³ NMP.mL⁻¹ é considerado um indicativo de higiene deficitária na obtenção do produto, e elevada contagem de coliformes a 35°C no alimento pode

indicar a presença de bactérias como *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Citrobacter*, dentre outras, responsáveis por causarem quadros de gastroenterites (CITADIN et al., 2009).

Escherichia coli foi encontrada em 76% (19/25) nas amostras de leite. Apesar de *E. coli* não patogênica prevalecer no trato digestivo dos bovinos (LAVEN; ASHMORE; STEWART, 2003), sua presença no leite serve de indicador para a presença de bactérias patogênicas que alteram a qualidade do produto colocando em risco a saúde dos consumidores (LACERDA; MOTA; SENA., 2009).

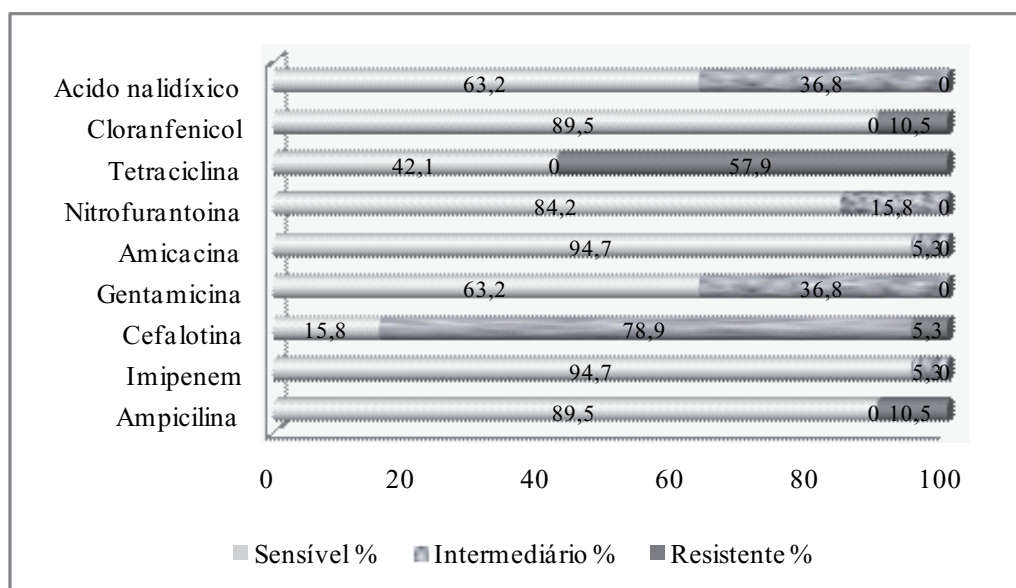
As contagens de *Staphylococcus* spp. variaram de $1,0 \times 10^4$ a $3,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹. Lamaita et al. (2005) relataram alta população de *Staphylococcus* spp. ($1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹) em leite *in natura* em Minas Gerais. *Staphylococcus* coagulase positiva foi identificado em 44% das amostras, sendo a maior média ($2,9 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) observada nas amostras de leite obtidas nos açougues (Tabela 1), com diferença significativa ($P > 0,05$) entre os estabelecimentos. Esses dados corroboram com Maciel et al. (2008) ao relataram contagens de *S. aureus* na ordem de 10^5 - 10^6 UFC.mL⁻¹ em 33,3% do leite analisado. Nos açougues de Cruz das Almas as condições higiênicas-sanitárias foram as mais precárias, sendo visível a presença de insetos, restos de sangue dos animais abatidos, bem como a comercialização simultânea de carne e leite, além da manipulação de dinheiro. Embora o Ministério da Saúde não estabeleça padrão microbiológico para *Staphylococcus* coagulase positiva no leite *in natura*, a presença do patógeno nos alimentos a partir de $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ têm importância epidemiológica por propiciar intoxicação alimentar, sendo que $0,375 \mu\text{g}$ da enterotoxina estafilocócica/Kg corpóreo é suficiente para causar um quadro de intoxicação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Salmonella spp. não foi encontrada nas amostras de leite analisadas. Apesar da ausência de *Salmonella* nas amostras, a elevada carga microbiana no leite *in natura* ressalta falhas graves de higiene na obtenção, armazenamento, distribuição e comercialização do alimento (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Nos estabelecimentos estudados, observou-se por diversas vezes a comercialização do leite em recipientes de plástico, muitos deles reutilizados e mal higienizados. O produto também foi encontrado armazenado em latões ou embalado em saco plástico de 1 litro à temperatura ambiente. Em alguns estabelecimentos não foi possível verificar a forma de armazenamento pelo fato do produto ficar armazenado fora do alcance dos consumidores.

Embora a comercialização do leite *in natura* seja legalmente proibida no país, à falta de fiscalização pelos órgãos competentes não tem impedido o mercado informal do alimento. O que se observa é a comercialização de um produto de má qualidade, que não oferece segurança aos consumidores. A falta de estrutura nas propriedades leiteiras no município de Cruz das Almas, sem um laticínio que possa receber o leite, faz com que os produtores comercializem o produto sem tratamento térmico, no comércio local ou diretamente com os consumidores.

Com relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, embora *E. coli* tenha apresentado mais de 80% de suscetibilidade aos antimicrobianos cloranfenicol, nitrofurantoina, amicacina, imipinem e ampicilina, a elevada resistência a tetraciclina (57,9%) e resistência intermediária ao ácido nalidíxico (36,8%), a gentamicina (36,8%) e a cefalotina (78,9%) (Figura 1) sugere o uso de antimicrobianos na alimentação animal, uma vez que a pressão seletiva exercida pelo uso intensivo dessas drogas tem reforçado o desenvolvimento de resistência aos micro-organismos (MANIE et al., 1998).

Figura 1. Percentual de suscetibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia, durante o período de abril a setembro de 2010.

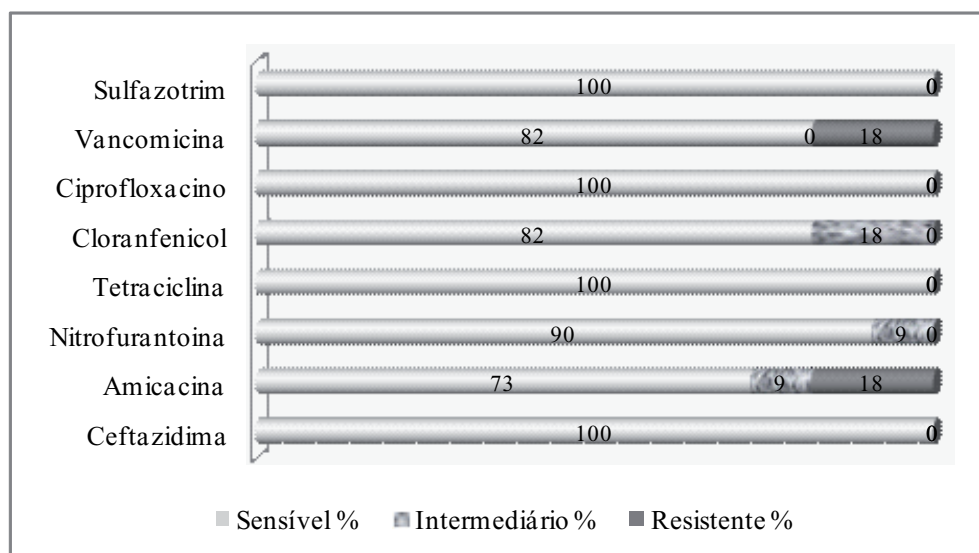
Fonte: Elaboração dos autores.

A resistência aos β -lactâmicos pode ocorrer em virtude de sua ampla utilização no tratamento de infecções no gado leiteiro e em vacas em lactação (COSTA, 2002). Tetzner et al. (2005) analisando amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro, MG observaram positividade para os betalactâmicos em 33,3% das amostras. A legislação brasileira proíbe o uso de promotores de crescimento como os anfenicóis, tetraciclina, betalactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 2009). Apesar disso, tem-se observado cada vez mais um aumento no número de bactérias resistentes à tetraciclina (MOTA et al., 2005). O aumento da resistência à tetraciclina ocorre porque vários genes de resistência a esse antimicrobiano são transferidos as bactérias sensíveis através de plasmídeos ou outros elementos cromossômicos móveis após o evento de conjugação (MELVILLE et al., 2004). Desse modo, antimicrobianos usados na medicina veterinária

promovem resistência cruzada com antimicrobianos utilizados na medicina humana, contribuindo para a aquisição de resistência de micro-organismos patógenos humanos (BIACCHI; JORGE; UENO, 2004). Carlos et al. (2004), avaliando o leite tipo "C" no município de Campos dos Goytacazes, RJ relataram que apenas em 07 (32,56%) de 43 amostras de leite não foi detectado a presença de resíduo de penicilina.

Para as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva 100% de susceptibilidade foi observada para o sulfazotrim, ciprofloxacino, tetraciclina e ceftazidima (Figura 2). A elevada suscetibilidade antimicrobiana em *Staphylococcus* coagulase positiva, principal agente responsável por causar mastite no rebanho leiteiro, é satisfatória, embora não se possa afirmar se esses micro-organismos presentes no leite foram provenientes do rebanho leiteiro ou dos produtores ou manipuladores em virtude de falhas higiênicas-sanitárias.

Figura 2. Percentual de suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de amostras de leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia, durante o período de abril a setembro de 2010.



Fonte: Elaboração dos autores.

Segundo Colli, Pizzolitto e Raddi (2009) a vigilância dos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos para *S. aureus* é importante para a compreensão das tendências emergentes de resistência. Enquanto o melhoramento nos métodos de manejo animal, introdução de programas de vacinação e a elaboração de uma legislação que regulasse o uso de antimicrobianos na veterinária, poderia promover a suspensão dos antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000).

As estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram resistência à vancomicina e a amicacina em 18% (Figura 2). A resistência adquirida as quinolonas tem ocorrido há algumas décadas e por isso, a vancomicina tornou-se uma das últimas opções terapêuticas contra bactérias multirresistentes, o que fez com que sua aplicação na medicina veterinária fosse proibida (CRUZ, 2009). De ação bactericida, essa droga atua contra bactérias Gram-positivas, impedindo a síntese da

parede celular bacteriana pela inibição da liberação de um polímero da membrana celular (ANDRADE, 2002). Pontes Netto et al. (2005) observaram que os aminoglicosídeos foram o segundo maior grupo de antimicrobianos usados na terapêutica do gado leiteiro no Paraná, Brasil no período de 2003.

Sete estirpes de *E. coli* apresentaram índice MAR igual a 22%, ou seja, resistência a dois antimicrobianos, enquanto para *Staphylococcus* coagulase positiva, o índice foi de 12,5%, sem perfil de multiresistência (Tabela 2). Nascimento, Maestro e Campos (2001) testando bactérias patogênicas isoladas de leite em Piracicaba, SP, relataram resistência múltipla de 27% para os coliformes e 3% para *Staphylococcus aureus*. Para o autor, apesar da legislação regulamentar a presença de resíduos de antibióticos no leite, os produtores não têm o rigor de cumpri-las e nem a fiscalização vigente dos órgãos competentes pode garantir a segurança dos alimentos, tanto do leite quanto de seus derivados.

Tabela 2. Índice de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) e perfil de resistência plasmidial de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de leite *in natura*, obtido no comércio varejista de Cruz das Almas, Bahia, durante o período de abril a setembro de 2010.

Cepa	Antimicrobianos	MAR (%)	Resistência Plasmidial
Ec 2	TET – CFL	22,22	-
Ec 7	AMP – TET	22,22	AMP – TET
Ec 8	TET	22,22	TET
Ec 9	TET	11,11	-
Ec 11	TET	11,11	-
Ec 12	TET	11,11	-
Ec 13	TET	11,11	-
Ec 14	AMP – TET	22,22	-
Ec 17	TET	22,22	TET
Ec 18	CLO – TET	22,22	CLO – TET
Ec 19	CLO – TET	22,22	-
Sc+ 10	AMI	12,5	-
Sc+ 23	VAN	12,5	-
Sc+ 25	AMI	12,5	-

Ec = *E. coli*; Sc+ = *Staphylococcus* coagulase positiva.

TET = tetraciclina; AMP = ampicilina; CFL = cloranfenicol; VAN = vancomicina; AMI = amicacina.

Fonte: Elaboração dos autores.

Perfil de multirresistência mediada por plasmídeo foi observado em 57% das estirpes de *E. coli* (Tabela 2). Os plasmídios contêm genes de resistência que podem se replicar independentemente do cromossomo hospedeiro, sendo distinguidos por sua origem e repetição, onde uma única bactéria pode abrigar múltiplos plasmídios (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Já para a resistência cromossômica os genes são transferidos com frequência relativamente baixa e o seu impacto clínico é menor que o da resistência plasmidial (SILVA, et al., 2009).

O aumento da resistência está relacionado ao uso abusivo de antimicrobianos, embora atualmente os órgãos competentes venham tentando controlar mais efetivamente a utilização dessas drogas pela população. Segundo Freitas et al. (2004) os antimicrobianos têm ação destrutiva nas células bacterianas, e o surgimento de resistência múltipla aos antibióticos, representa um risco potencial à saúde pública podendo dificultar o tratamento de doenças humanas e animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis.

O leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas apresenta elevada carga microbiana, podendo servir de veículo para surtos de toxinfecções alimentares. Por outro lado, o perfil de resistência a gentamicina e vancomicina nas estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva e multirresistência nas cepas de *E. coli* demonstram o risco potencial na disseminação de micro-organismos resistentes a diversas drogas à população usuária do alimento, na ausência de tratamento térmico.

Referências

- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, B. S. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, Massachusetts, v. 128, n.6, p. 1037-1050, 2007.
- ALMEIDA, L. P.; VIEIRA, R. L.; ROSSI, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Antibiotic residues in milk of rural properties of Uberlândia – MG region. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 19, n. 3, p. 83-87, 2003.
- ALVES, L. M. C.; AMARAL, L. A.; CORRÊA, M. R.; SALES, S. S. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís – Ma. *Pesquisa em Foco*, São Luís, v. 17, n. 2, p. 1-13, 2009.

- ANDRADE, S. P. *Manual de terapêutica veterinária*. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2002. 697 p.
- BIACCHI, N. C.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Detection of antibiotics residues in cow milk in Vale do Paraíba, São Paulo. *Revista Biociências*, Taubaté, v. 10, n. 1, p. 47-49, 2004.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. G. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº26 de 09 de julho de 2009. Aprova o Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 10 jul. 2009. seção 1, p. 14.
- _____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. (Regulamento Técnico de Produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite). *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 30 dez. 2011. seção 1, p. 6.
- CARLOS, L. A.; CORDEIRO, C. A. M.; FOLLY, M. M.; MARTINS, M. L. L. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo “C” comercializado no município de Campos dos Goytacazes, RJ. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 57-60, 2004.
- CITADIN, A. S.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Microbiological quality of raw milk and factors that influence its quality. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 10, n.1, p. 52-59, 2009.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing*. Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Wayne, PA: CLSI, 2005.
- COLLI, V. C.; PIZZOLITTO, A. C.; RADDI, M. S. G. Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio? *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 30, n. 1, p. 115-118, 2009.
- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (Ed.). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 443-455.
- CRUZ, A. R. *Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>> Acesso em: 20 nov. 2012.
- MACIEL, J. F.; CARVALHO, E. A.; SANTOS, L. S.; ARAUJO, J. B.; NUNES, V. S. Microbiological quality of raw milk marketed in Itapetinga-BA. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 9, n. 3, p. 443-448, 2008.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; LEÃO, A. E. D. S.; FIGUEIREDO, M. L.; FONTE, M. M.; VIEIRA, R. F. C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 405-407, 2004.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.
- HIRSCH, D.; PEREIRA JUNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identification and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* isolated from fish and aquatic environment. *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.
- LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 569-575, 2009.
- LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.
- LAVEN, R. A.; ASHMORE, A.; STEWART, C. S. *Escherichia coli* in the rumen and colon of slaughter cattle, with particular reference to *E. coli* O157. *The Veterinary Journal*, London, v. 165, n. 1, p. 78-83, 2003.

- MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V. S.; VEITH, W. J.; GOUWS, P. A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in south Africa. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 26, n. 4, p. 253-258, 1998.
- MELO, B. A.; SANTOS, T. M. C.; BARBOSA, Y. R. S.; MOURA, C. T. R.; MONTALDO, Y. C. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas. *Revista Verde*, Mossoró, v. 5, n. 5, p. 1-5, 2010.
- MELVILLE, C. M.; SCOTT, K. P.; MERCER, D. K.; FLINT, H. J. The Butyrovibrio fibrisolvens tet (W) gene is carried on the novel conjugative transposon TnB1230 which contains duplicated nitroreductase coding sequences. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 186, n. 11, p. 3656-3659, 2004.
- MOLINA-AJA, A.; GARCÍA-GASCA, A.; ABREU-GROBOIS, A.; BOLAN-MEJIA, C.; ROQUE, A.; GOMEZ-GIL, B. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 213, n. 1, p. 7-12, 2002.
- MOTA, A. M.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. The abuse of antimicrobials drugs and the appearance of resistance. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrências de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, São Paulo, Brasil. 2001. *Brazilian Journal of Nutrition*, Campinas, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2001.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- PONTES NETO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; VEDOVELLO FILHO, D. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 105-111, 2005.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Milk contamination in different points of the process: I) Aerobic mesophilic and psychrotrophic microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.
- SCHEDLER, C. A.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Microbiological quality of raw milk and factors that influence its quality. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536 p.
- SILVA, N. S.; OLIVERIA, A. C.; CANESINI, R.; ROCHA, J. R.; PERREIRA, R. E. P. Mecanismos de resistência bacteriana. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça, ano 7, v. 12, p.1-4, 2009. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria12/revisao/pdf/AnoVII-Edic12-Rev101.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2012.
- TETZNER, T. A. D.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C.; PERES, R. F. G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 19, n. 130, p. 69-72, 2005.
- TORKAR, K. G.; VENGUST, A. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M-1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control*, Guildford, v. 19, n. 6, p. 570-577, 2008.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Philadelphia, v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.
- ZOCHE, F.; BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V. C.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo produzido na região oeste do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 59-67, 2002.

