

**RESISTÊNCIA MICROBIANA EM CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* E
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL NO
MUNICÍPIO DE GUARAÍ-TOCANTINS, BRASIL****MICROBIAL RESISTANCE IN STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* AND
KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATED FROM ARTISANAL CHEESE IN THE
MUNICIPALITY OF GUARAÍ, TOCANTINS, BRAZIL**Liberta Lamarta Favoritto Garcia Neres¹Julio Cesar Ibiapina Neres²**RESUMO**

O estudo objetivou-se em avaliar a qualidade microbiológica de queijos frescos e sua viabilidade comercial. Para tanto, foram avaliadas 80 amostras de queijos de diferentes produtores para confirmação de coliformes totais e termotolerantes. A partir das culturas positivas foram empregadas para identificação por correlação a aparência colonial, coloração de Gram e provas bioquímicas. Além disso, avaliou-se a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos. Em 97,5% das amostras foi confirmada a presença de *Escherichia coli* e em 2,5% foi identificada a existência de *Klebsiella pneumoniae*. As cepas de *E. coli* (84,8%) evidenciaram alta sensibilidade aos antibióticos, enquanto 100 % das cepas de *K. pneumoniae* foram multirresistentes. Pelos resultados obtidos concluiu-se que os queijos apresentaram baixa qualidade microbiológica, deficiência das condições higiênicas sanitárias, representando um risco potencial que este produto pode significar para a saúde pública.

Palavras-chave: Coliformes Termotolerantes; Queijos Coalho; Qualidade Sanitária.

ABSTRACT

The study aimed to assess the microbiological quality of fresh cheeses and their commercial viability. To achieve this, 80 samples from different producers were evaluated to confirm the presence of total and thermotolerant coliforms. Positive cultures were then used for identification through colonial appearance, Gram staining, and biochemical tests. Additionally, *in vitro* antimicrobial sensitivity and the multiple antimicrobial resistance index were assessed. *Escherichia coli* was confirmed in 97.5% of the samples, and *Klebsiella pneumoniae* was identified in 2.5%. *E. coli* strains

¹ Professor Adjunto da Instituto Educacional Santa Catarina – Faculdade Guaraí – IESC/FAG; Guaraí-TO, e-mail: liberta.neres@iescfag.edu.br

² Professor Adjunto da Instituto Educacional Santa Catarina – Faculdade Guaraí – IESC/FAG; Guaraí-TO, e-mail: julio.neres@iescfag.edu.br

(84.8%) showed high sensitivity to antibiotics, while 100% of *K. pneumoniae* strains were multidrug-resistant. Based on the results, it was concluded that the cheeses exhibited low microbiological quality, indicating deficiencies in hygienic-sanitary conditions, representing a potential risk to public health.

Keywords: Thermotolerant coliforms; Coalho cheeses; Sanitary Quality.

1 INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais são produzidos em pequenas propriedades, e em alguns casos a fabricação deles é realizada sem a adequada higienização do local e sem a pasteurização da matéria prima. Devido a sua composição nutricional e a falta dos devidos cuidados higiênico-sanitários, o queijo fresco artesanal se constitui em um importante meio para a proliferação de microrganismos patogênicos (SABIKHI; BHONGLE; SATHISH, 2015).

Um das características que torna o queijo tipo frescal artesanal um alimento que pode oferecer riscos à saúde humana, é o fato de ele ser constituído a base de leite cru e não passar por um processo de maturação, como também o local de sua produção, na grande maioria, ser um estabelecimento onde as condições higiênico-sanitárias são insatisfatórias (EVANGELISTA-BARRETO, et al., 2016). A circulação dos patógenos por meio dos alimentos é muito comum e pode representar um risco potencial à saúde do consumidor. Portanto, a fim de evitar isso, boas práticas de higiene são necessárias em toda a cadeia de produção (RASHEED, et al., 2014; MOUSSÉ, et al., 2016).

Por isto, há preocupação em torno dos alimentos sobre a possibilidade de os mesmos transmitirem a população microrganismos patogênicos tais como bactérias do grupo dos coliformes, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Clostridium*, *Salmonella*, entre outros, provocando o surgimento de surtos de toxinfecções alimentares de gravidade, causando desde um simples mal-estar até a ocorrência de casos fatais (RODRIGUES; FERREIRA, 2016).

É necessário compreender a importância de promover adoção de boas práticas na cadeia de produção de derivados do leite, para desta forma obter produtos manufaturados de qualidade. No entanto, em algumas propriedades o processo de ordenha é realizado sem higienização, acondicionamento inadequado ou na demora da destinação do leite pode acelerar o aumento do número de microrganismos patogênicos capazes de causar a deterioração do produto inviabilizando para o consumo *in natura* ou provocando várias doenças aos consumidores (DANTAS, et al., 2013; FONTANETTI, et al., 2015).

Portanto, a população em geral deve ter ao seu alcance alimentos de qualidade, que atenda padrões estabelecidos e condições higiênicas que propiciem uma alimentação saudável para os consumidores e não um veículo de doenças transmitidas por alimentos contaminados, pondo em risco a saúde pública (SALOTTI, et al., 2006).

Com a finalidade de se evitar a contaminação durante o processo de produção do queijo, deve-se observar o indicador para a presença de coliformes totais e termotolerantes nos alimentos em quantidade elevada e dentre esses patógenos,

observou – se um indicador específico de contaminação, sendo esta a *Escherichia coli* (GASPAROTTO; ROCHA; GRECELLÉ, 2008; DORES, et al., 2013).

A *Escherichia coli* é uma das bactérias mais estudadas e representante do grupo dos coliformes termotolerantes. É caracterizada por ser uma gram-negativa, fermentadora de lactose com consequente produção de gás e tem como consequência, além da alteração das características organolépticas do alimento, o estufamento da embalagem (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). *Escherichia coli* é a espécie anaeróbia facultativa mais prevalente no trato gastrointestinal de humanos e animais, geralmente um micróbio inofensivo, mas também é uma bactéria importante do ponto de vista médico, causando uma série de doenças significativas (RASHEED, et al., 2014).

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista que causa uma variedade de doenças infecciosas em humanos, incluindo septicemia, abscessos hepáticos, diarreia e pneumonia. É um patógeno hospitalar bem conhecido e associado ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Além do ambiente clínico, *Klebsiella pneumoniae* é frequentemente encontrada em alimentos, incluindo vegetais crus, fórmulas infantis em pó, carne, peixe, laticínios, entre outros e, tem sido considerada como um importante patógeno de origem alimentar. Nos últimos anos, um número crescente de surtos de origem alimentar causados por *Klebsiella pneumoniae* foram relatados em diferentes países (YAO, et al., 2015; DAVIS; PRICE, 2016; GUO, et al., 2016; MILANOVIĆ, et al., 2017; ZHANG, et al., 2018).

O surgimento de cepas bacterianas resistentes a antimicrobianos são de grande preocupação mundial na medicina humana (HU, et al., 2013). Assim, a disseminação destas bactérias resistentes como resultado do consumo de alimentos contaminados, como carne mal cozida, frutos do mar crus, leite e produtos lácteos não pasteurizados, representa um risco a saúde pública (MILANOVIĆ, et al., 2017). Além disso, essas bactérias podem transferir determinantes de resistência a antibióticos para outras bactérias patogênicas (TORTORA; FUNKE, CASE, 2012).

Portanto, a vigilância e o monitoramento de bactérias resistentes a medicamentos em alimentos são importantes, na implantação de estratégias de controle direcionadas para selecionar antibióticos eficazes para o tratamento de doenças infecciosas (ZHANG, et al., 2018). Os patógenos resistentes mais comumente isolados da cadeia alimentar são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*, consequência do uso extensivo de antibióticos na pecuária com a finalidade de aumentar a produção animal e, da utilização indiscriminada na terapêutica, o qual representa pressão seletiva de genes de resistência nas bactérias (GUO, et al., 2016; ARENAS; MELO, 2018).

Considerando os aspectos descritos e, as características de produção e de comercialização do queijo fresco artesanal, no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil), é importante avaliar a qualidade microbiológica de queijos frescos e sua viabilidade comercial. O estudo teve como objetivo principal em avaliar o perfil de sensibilidade aos antibióticos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas dos queijos artesanais comercializados no município de Guaraí - TO.

MATERIAL E MÉTODOS

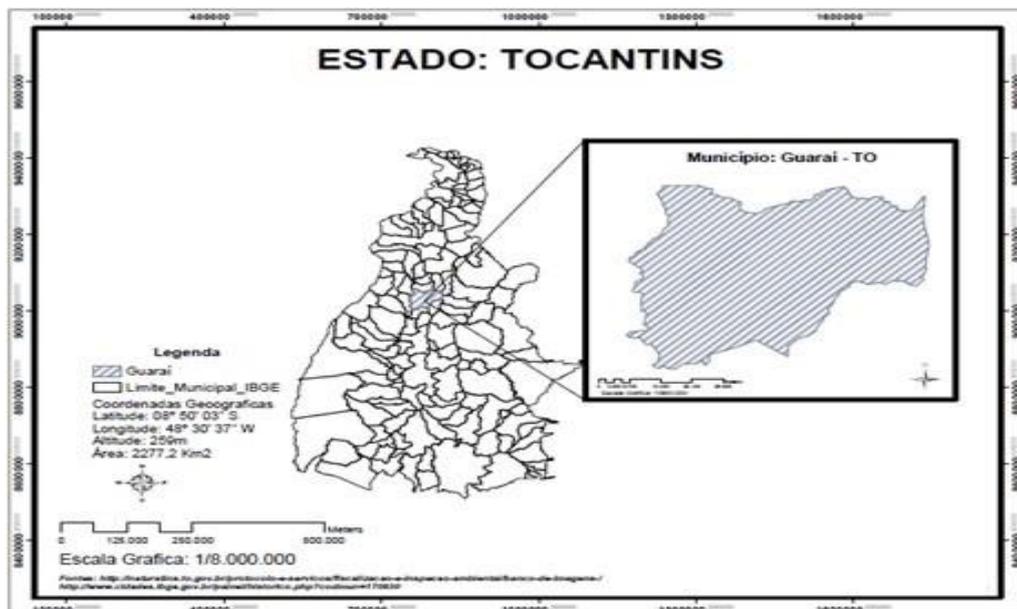
Tipo de estudo

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, caracterizado pelo emprego de quantificação nas modalidades de coleta de informação e no tratamento por meio de técnicas estatísticas utilizando o programa R, como percentual, média, desvio-padrão, mínimo e máximo, possibilitando, conseqüentemente, uma margem de segurança quanto às conclusões.

Caracterização da área de Estudo

O presente estudo trata-se de uma proposta de trabalho metodológico prático, que foi desenvolvido no município de Guaraí (Figura 1) com extensão territorial de 2.268 km² e está situado na Mesorregião Ocidental do Tocantins e Microrregião de Miracema do Tocantins, sede da 6ª Região Administrativa do Estado, distante 173 km da capital do Estado do Tocantins (Palmas). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE (2016), possui uma população de 25.399 habitantes de acordo com o censo demográfico de 2016, com coordenadas aproximadas 08°50'03" S e 48°30'37" W. O clima da região segundo a classificação é do tipo Aw com clima tropical e inverno seco (KÖPPEN, 1948). O município é considerado como um importante centro comercial. Além disso, sua economia baseia-se na agricultura e pecuária.

Figura 01: Estado do Tocantins, com destaque para o município de Guaraí.



Fonte: Autoria própria.

Obtenção das amostras

Foram adquiridas 80 amostras de queijos artesanais, provenientes de oito produtores, e comercializados na feira livre no município de Guaraí (Figura 2). As

amostras foram adquiridas no período de junho de 2017 a abril de 2018, colhidas aleatoriamente em diferentes pontos, correspondendo a dez repetições por produtor.

Figura 02: Feira livre do município de Guaraí – TO.



Fonte: Autoria própria.

As amostras foram dispostas em embalagem plástica individual, não contendo qualquer informação sobre sua origem, informação nutricional e data de fabricação (Figura 3A e 3B). Durante o transporte, as amostras foram mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo, com o intuito de evitar que fatores externos interferissem no produto e nos resultados das análises microbiológicas.

As análises das amostras foram divididas em duas etapas: a primeira, para detecção de coliformes totais e termotolerantes, foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Instituto Educacional Santa Catarina, Faculdade Guaraí, Campus de Guaraí/TO; a segunda etapa, para confirmação bioquímica dos isolados bacterianos e realização dos antibiogramas, foi executada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, Fernandópolis – São Paulo.

Figura 03 (A, B): Comercialização do queijo na feira livre.

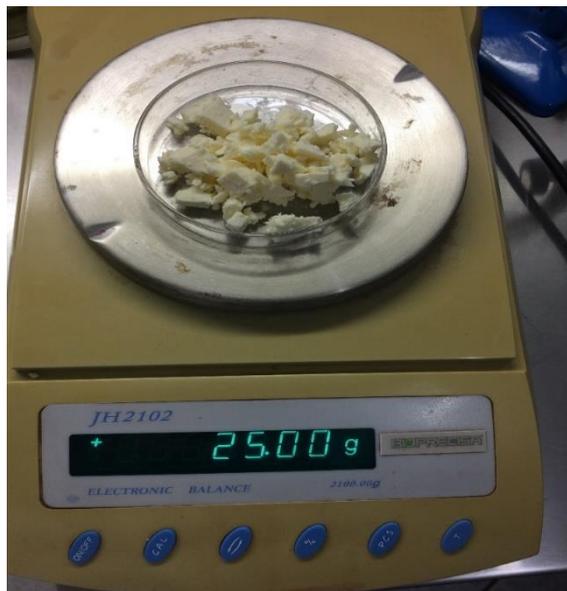


Fonte: Autoria própria.

Preparo da Amostra

De cada amostra de queijo fresco tipo artesanal, foram colhidos assepticamente 25g (Figura 4), os quais foram triturados e transferidos para frasco Erlenmeyer com 225 mL de água salina peptonada estéril (0,1%). Esta diluição correspondeu a uma proporção de 1:10, ou seja, 10mL do homogeneizado continha um mililitro da amostra. A partir da diluição inicial, a diluição 1:100 foi feita retirando-se 1 mL da diluição inicial e adicionando-se a 9,0 mL do diluente (água salina peptonada 0,1%) em um segundo tubo; a diluição 1:1000 foi preparada retirando-se 1mL da diluição 1:100 e adicionado a 9,0 mL do diluente em um terceiro tubo, observando se sempre o uso do mesmo diluente. Estas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram usadas para posterior procedimento microbiológico. O experimento foi conduzido em triplicata.

Figura 04: Amostra sendo pesada na balança do fluxo laminar.



Fonte: Autoria própria.

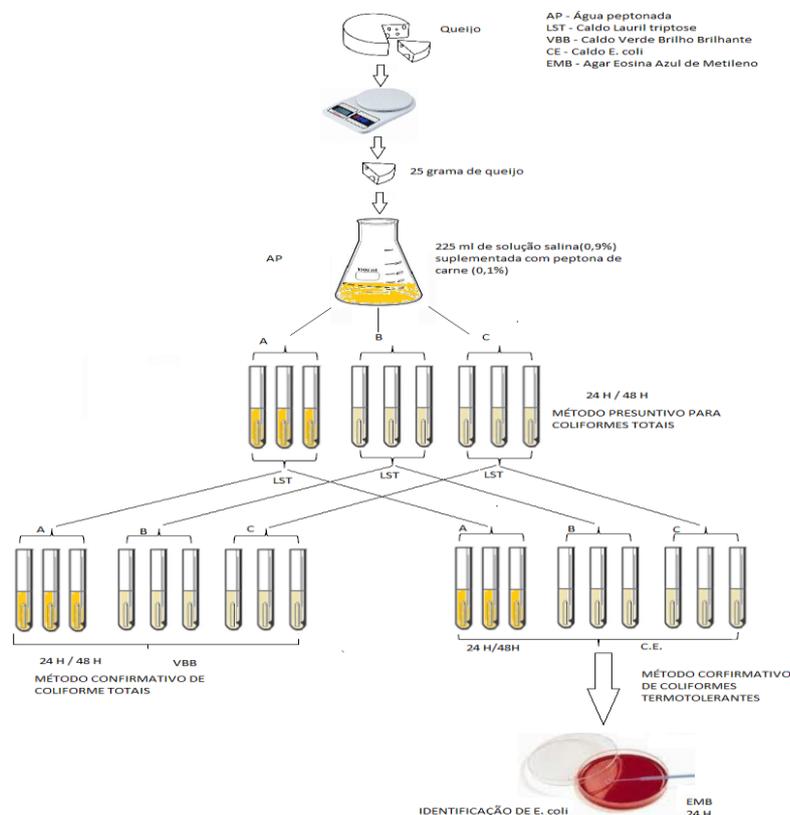
Técnica de Tubos Múltiplos

A quantificação dos coliformes totais e termotolerantes foi designada pelo método do Número Mais Provável (NMP) com auxílio da tabela de Hoskins citado por Silva et al., (2007). A mesma deu-se em duas fases: determinação do NMP/g de Coliformes Totais e termotolerantes (Anexo A).

Para obter dados fidedignos sobre a pesquisa de queijos comercializados e no sentido de evitar contaminação dos meios, adotaram-se medidas que evitassem contaminação externa, para isso todas as etapas foram executadas no interior da capela de fluxo laminar. Em relação as vidrarias, foram esterilizadas em autoclaves a uma temperatura de 121° C por um período de 20 minutos e secas em estufas à 170° C por um período de 1 hora, garantindo maior condição asséptica do material. Sobre o manuseio das hastes e alças de platinas, para garantir sua esterilidade, foram flambadas em bico de Bunsen, durante o tempo necessário para que elas ficassem rubras.

Para obtenção dos números mais prováveis (NMP/g) de Coliformes Totais utilizou-se a técnica de tubos múltiplos, na qual foram utilizados nove tubos, agrupados na sequência de três em três, conforme a diluição, e posteriormente agrupados para fazer a contagem utilizando a Tabela do Número Mais Provável por grama ou mL, para séries de 3 tubos com inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 g ou ml, e respectivos intervalos de confiança 95% (figura 5).

Figura 05: NMP/g ou mL de coliformes a 35°C e 45°C, e confirmação de *Escherichia coli*.

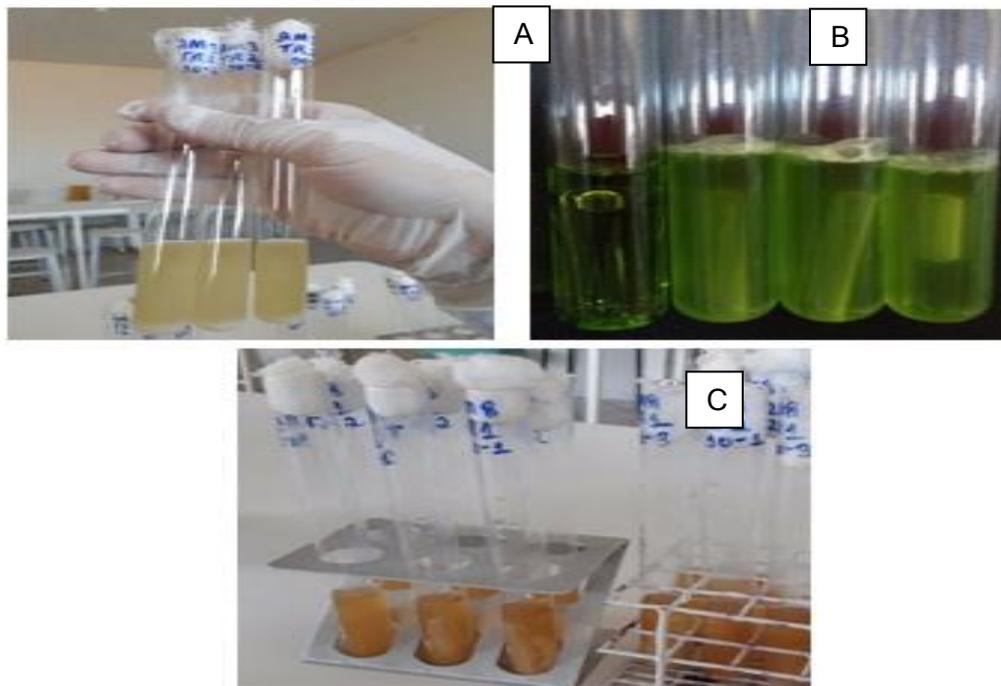


Fonte: Adaptado de Silva et al., (2010).

As amostras de queijo diluídas em água peptonada (0,1%) foram submetidas a teste presuntivo: três alíquotas de três diluições foram inoculadas em uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição. O LST foi usado para observação do crescimento de microrganismo, e separado aqueles que produziram gás a partir da lactose, no período entre 24 a 48h de incubação a 35°C, sendo considerado suspeito (presuntiva) de conter coliformes (figura 6A) (SILVA, et al., 2010).

Para a confirmação dos coliformes totais e termotolerantes, uma alçada de cada tubo considerado suspeito, foi transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *Echerichia coli* (EC), meios seletivos que contendo a lactose. A observação de crescimento com produção de gás nos tubos VB, foi verificada entre o período de 24 a 48h de incubação a 35°C, sendo considerada confirmativa de coliformes totais (figura 6B). O crescimento com produção de gás nos tubos EC, após 24h de incubação a 45,5°C, foi considerada confirmativa da presença de coliformes termotolerantes (Figura 6C) (SILVA, et al., 2010). O Experimento foi conduzido em triplicata.

Figura 06: Método da presença e ausência em meio de cultura específico. A: Lauril Sulfato Triptose-LST, B: Verde Bile Brilhante-VB e C: Caldo *Escherichia coli*.

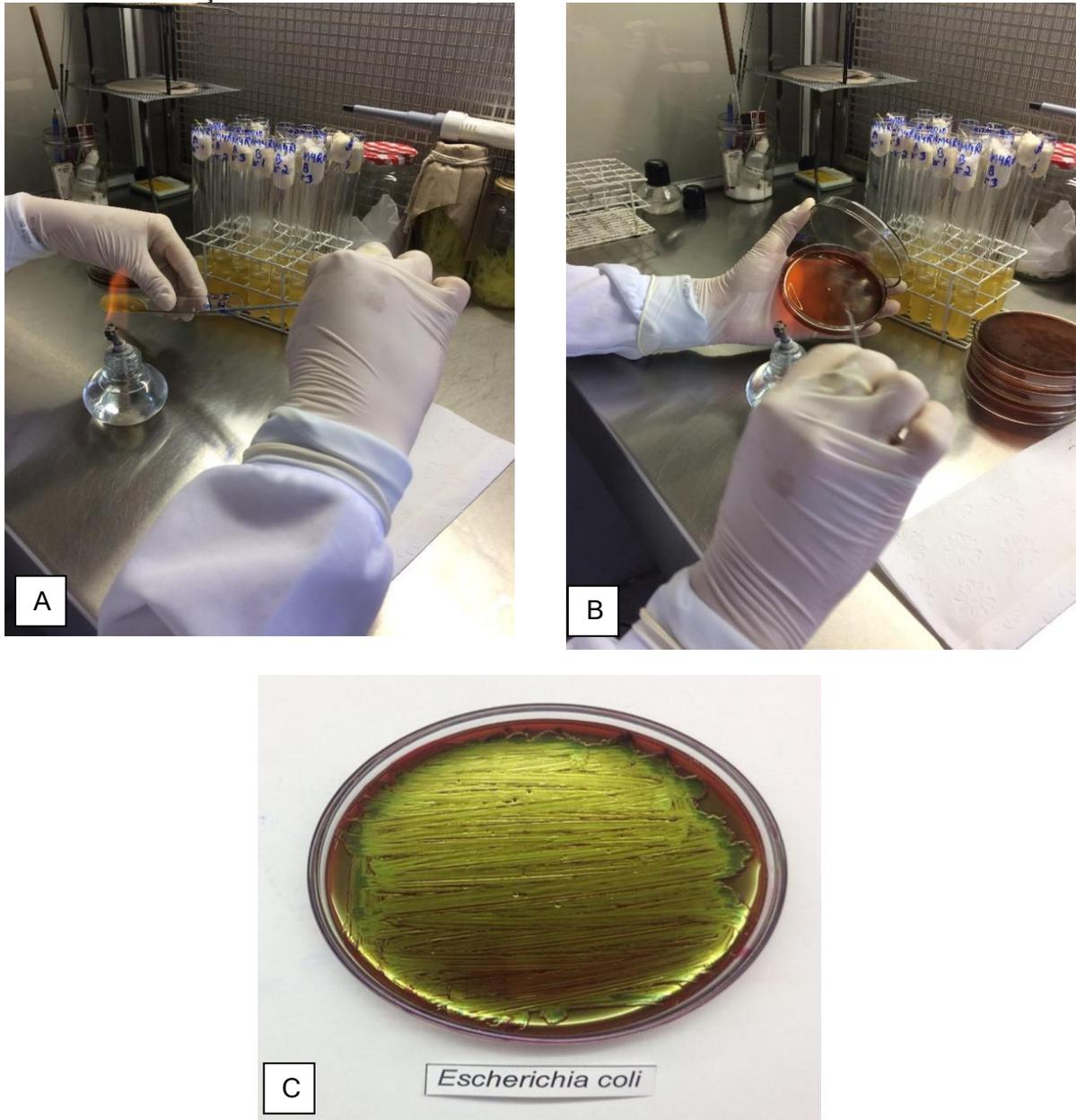


Fonte: Autoria própria.

Justifica-se a utilização dos dois caldos (VB e CE), uma vez que ambos são utilizados como métodos confirmativos para coliformes totais e termotolerantes

De cada tubo de EC positivo (figura 7A) com produção de gás, estriou-se uma alçada em placa contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (figura 7B) sendo as mesmas incubadas a 35° C por 24 horas, e posteriormente foi observado se houve desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico (figura 7C).

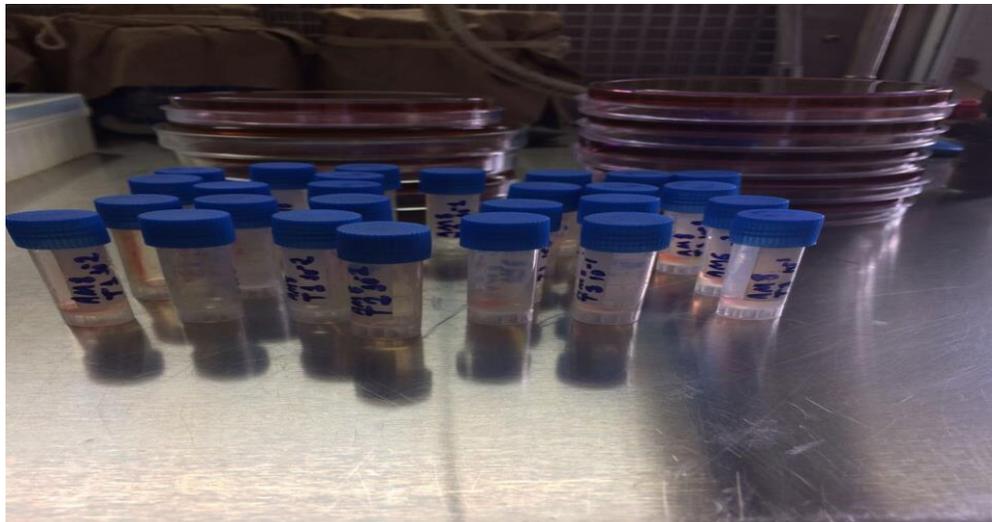
Figura 07 (A, B, C): Estrramento de amostras positivas em Caldo *E. coli* em meio Eosina Azul de Metileno e identificação de *Escherichia coli*.



Fonte: Autoria própria.

Na sequência do procedimento observou-se o desenvolvimento de colônias típicas de *Escherichia coli* (colônias com brilho metálico ou pretas) e armazenadas em tubos criogênicos (figura 8) e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil em Fernandópolis – São Paulo para serem feitas a confirmação bioquímicas e os antibiogramas.

Figura 08: Armazenamento de cepas bacterianas em tubos criogênicos.



Fonte: Autoria própria.

Confirmação Bioquímica

As culturas positivas foram empregadas para identificação por correlação a aparência colonial, coloração de Gram, reação oxidase, e reações bioquímicas utilizando sistema API 20E (BioMérieur).

Antibiograma

Para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, utilizou-se o método de Kirby Bauer modificado, tal como recomendado pelo Clinical Laboratory Standard Institute (Clinical laboratory).

Foram avaliados os antimicrobianos: tobramicina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetropim, clorafenicol, ceftazidima, ampicilina, amicacina, aztreonam, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, amoxicilina/ácido clavulânico e cefazolina. Os resultados foram interpretados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo CLSI.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado pela razão entre o número de antibióticos aos quais o isolado foi resistente e o número de antibióticos ao qual o isolado foi exposto, sendo que o IRMA superior a 0,2 caracteriza multirresistência (KRUMPERMAN, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das análises para coliformes totais (Tabela 1) indicaram um valor mínimo de <3,0 e máximo de >1100, com variação média de 883,9 a 1036. Em relação ao desvio padrão, ocorreu uma variação entre 64 e 144,1, demonstrando uma baixa variação dos valores obtidos em relação à média.

Os resultados obtidos evidenciaram excessiva contaminação microbiológica nos queijos frescal artesanal, verificando-se elevada contagem de coliformes totais, indicando provável ausência de boas práticas de higienização no processo de fabricação e manipulação do alimento. A presença de coliformes totais está associada a práticas inadequadas de higienização durante o processamento e a alta taxa de contaminação está relacionada com ausência de controle higiênico sanitário na produção desse alimento, sendo que quanto maior a quantidade de microrganismos detectada, mais precária é a condição higiênica sanitária do produto (SILVA, et al., 2007; KIRANMAYI, et al., 2011).

Tabela 01: Média dos resultados do NMP/g de coliformes totais isolados de queijos frescal artesanal produzidos no município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil).

PRODUTOR	MÉDIA	DP	MÁXIMO	MÍNIMO
1	941,0	108,5	>1100	150
2	933,0	111,4	>1100	240
3	912,5	126,4	>1100	35
4	1036,0	64,0	>1100	460
5	1014,0	86,0	>1100	240
6	1019,0	81,0	>1100	290
7	883,9	144,1	>1100	<3,0
8	1036,0	64,0	>1100	460

Fonte: Autoria própria.

A determinação de coliformes termotolerantes revelou uma variação média de 663,7 a 1036, com um valor mínimo de < 3,0 e máximo >1100. Em relação ao desvio padrão, ocorreu uma variação entre 64 e 178,1, demonstrando uma baixa variação dos valores obtidos em relação à média dos resultados encontrados nas amostras, conforme tabela 2.

O valor da média das 80 amostras para o número mais provável de coliformes termotolerantes ficaram acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, conforme a resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro 2001 (BRASIL, 2001), que apresenta limite de tolerância para coliformes termotolerantes de 5×10^2 NMP/g. Com base neste limite, verificou-se que a média obtida para NMP/g de termotolerantes encontrados nos queijos frescal artesanal estava fora dos padrões da legislação (Tabela 2), considerados por tanto inadequados para comercialização e, conseqüentemente, ao consumo humano.

Os resultados obtidos na presente pesquisa são semelhantes aos obtidos por Ferreira, et al., (2011) que constataram que 70% das amostras de queijo avaliadas apresentaram contagens superiores a legislação vigente de coliformes termotolerantes. Nunes; Alencar; Caldas (2013) verificaram que 13% das amostras de

leite e derivados lácteos comercializadas no Distrito Federal foram rejeitadas pelas altas contagens de coliformes termotolerantes, encontradas principalmente em queijos artesanais. Garcia, et al., (2016) também observou que 89% dos queijos artesanais comercializados no município de Montes Claros-MG estavam fora dos padrões da legislação vigente brasileira. Assim como Wolupeck, et al., (2012), verificaram que 78,18% do queijo artesanal comercializado em Curitiba – PR estava com valores acima do permitido e Santana, et al., (2008) constatou que as amostras apresentaram uma presença significativa de alta contagem de bactérias termotolerantes em 80% das amostras analisadas em Aracaju-SE. Essa alta contagem microbiana pode ser atribuída às condições higiênicas e sanitárias inadequadas de produção e da comercialização dos queijos produzidos de maneira artesanal (PINTO, et al., 2011).

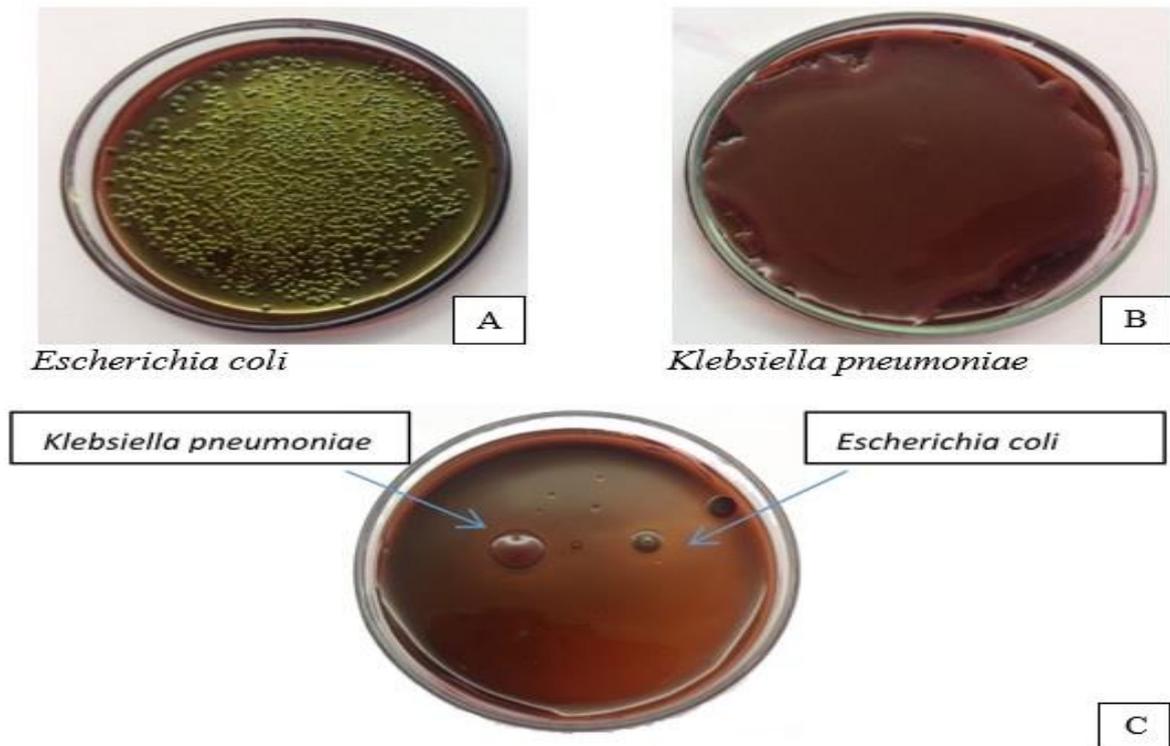
Tabela 02: Média de NMP/g de coliformes termotolerantes nos isolados de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil).

PRODUTOR	MÉDIA	DP	MÁXIMO	MÍNIMO
1	782,3	161,9	>1100	7,4
2	792,8	157,4	>1100	<3,0
3	955,0	97,5	>1100	290
4	773,3	139,3	>1100	<3,0
5	880,7	146,2	>1100	<3,0
6	663,7	178,1	>1100	<3,0
7	819,9	147,6	>1100	<3,0
8	1036,0	64,0	>1100	460

Fonte: Autoria própria.

Das 80 amostras avaliadas, 15% estavam dentro dos padrões para coliformes totais e 26,25% para coliformes termotolerantes. No entanto, verificou-se, que 85% apresentaram contagens de coliformes totais e 73,75 % com coliformes termotolerantes acima dos padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 2001). Em 97,5% das amostras foi confirmada a presença de *Escherichia coli* (Figura 9A) e em 2,5% foi identificada a presença de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 9B). E a associação de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas em queijos fabricados por três produtores é apresentada na Figura 9C.

Figura 09: Colônias típicas de *Escherichia coli* (A), apresentando coloração verde metálico em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), *Klebsiella pneumoniae* (B), e associação de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (C), isoladas de queijos frescal artesanal produzidos no Município de Guaraí, Estado do Tocantins (Brasil).



Fonte: Autoria própria.

As bactérias de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem eventualmente causar doença ao hospedeiro ou permanecer como um microrganismo residente com a capacidade de causar infecções oportunistas. Além disso, os genes adquiridos que conferem resistência aos antibióticos podem ser transferidos para a microbiota normal e induzir seleção por antibióticos sendo responsáveis pelo desenvolvimento de um grande número e variedade de infecções (FORSBERG, et al., 2012; RASHEED, et al., 2014). Além disso, algumas espécies de enterobactérias são consideradas oportunistas em indivíduos hospitalizados e imunodeprimidos (HLOPE; MCKERROW, 2014).

Para avaliação da sensibilidade/resistência aos antibióticos foram avaliadas todas as cepas de *E.coli* (n= 78) e de *K. pneumoniae* (n= 6) isoladas. Verificou-se maior porcentagem de cepas de *E. coli* resistentes a Ampicilina (7,69%, n= 6), seguidos por tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetropim (5,12%, n= 4), e cefotaxima (2,56% n= 2). Entre as cepas de *E. coli* não foi observado a resistência aos antibióticos aztreonam e cefazolina. Os resultados obtidos evidenciam alta sensibilidade aos antibióticos das cepas de *Escherichia coli* contaminantes dos queijos frescal. Este perfil de bactéria provavelmente está relacionado à produção não extensiva do gado no município, implicando na exígua utilização de antibióticos. Segundo Arenas; Melo (2018) o uso extensivo de antibióticos é uma prática comum

para aumentar a produção animal, implicando na contaminação ambiental, de alimentos com traços do antimicrobiano e o surgimento de patógenos resistentes.

As maiores porcentagens de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos foram verificadas para ampicilina e clorafenicol (83,33%, n= 5), tetraciclina, amicacina, cefotaxima, cefoxitina, amoxicilina/ácido clavulânico (50%, n= 3) e sulfametoxazol-trimetropim (33,33%, n= 2).

Todas as cepas apresentaram sensibilidade a aztreonam, ceftriaxona, cefepime e cefazolina; resultados semelhantes obtidos por Guo, et al., (2016) em cepas isoladas de diferentes alimentos de origem animal. Os autores observaram resistência contra dezesseis antibióticos, a maior taxa de resistência foi observada para ampicilina (92,3%), seguida por tetraciclina (31,3%), trimetoprim-sulfametoxazol (18,2%) e cloranfenicol (10,1%). Zhang, et al., (2018) verificaram que cepas de *K. Pneumoniae*, isoladas em alimentos comercializados na rua, apresentaram altos níveis de resistência à ampicilina (82,2%), à estreptomicina (11/62, 17,7%) e à piperacilina (16,1%). Estes autores afirmaram que a presença de *K. pneumoniae* multirresistentes a antibióticos e virulentas nos alimentos representa um perigo potencial para a saúde dos consumidores e ressaltam a importância da vigilância sanitária de *K. pneumoniae* em alimentos.

Na presente pesquisa as cepas de *E. coli* e de *K. pneumoniae* foram avaliadas quanto ao índice de multirresistência a antimicrobianos (IRMA > 0,20). As cepas de *E. coli* evidenciaram baixa multirresistência (IRMA= 0,25), correspondendo a 3,8% (n= 3). Os resultados obtidos evidenciaram que 84,8% (n= 65) das cepas de *E. coli* foram sensíveis a todos os antibióticos avaliados (IRMA= 0), constatando-se baixa incidência de resistência a estes antimicrobianos.

Portanto, a vigilância e o monitoramento de bactérias resistentes a medicamentos em alimentos são importantes para implementar as estratégias de controle direcionadas e selecionar medicamentos eficazes para o tratamento (ZHANG, et al., 2018).

Em relação as cepas *K. pneumoniae* verificou-se que 100% apresentaram IRMA de 0,31 (50%) e 0,37 (50%). Os alimentos, principalmente os de origem animal, são reservatórios de *K. pneumoniae* resistente a antimicrobianos. Estas bactérias podem ter o potencial de se tornar um risco para a saúde pública, sendo necessárias estratégias de monitoramento e prevenção aprimoradas para melhorar o controle do surgimento e a transmissão destes microrganismos (GUO, et al., 2016).

Diante dos resultados obtidos evidencia-se um problema de saúde pública devido à falta de boas práticas durante o processo de produção, presumindo que os queijos frescal artesanais comercializados pelos produtores na feira livre de Guaraí, no período da presente pesquisa, apresentaram alta contaminação por coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* o que inviabiliza o seu consumo.

Portanto, é possível questionar a qualidade da matéria prima, os métodos empregados na fabricação e propor um conjunto de normas para adoção de boas práticas de higienização para produção do queijo frescal artesanal no município. Neste contexto, a segurança alimentar pode ajudar a prevenir e melhorar a saúde da população, assim, a higiene continua a ser um ponto-chave na luta contra doenças infecciosas, especialmente nos países em desenvolvimento (MOUSSÉ, et al., 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de queijos apresentaram baixa qualidade microbiológica, indicando deficiência das condições higiênicas sanitárias, representando um risco potencial a saúde pública.

Diversas cepas de *Escherichia coli* apresentaram alta sensibilidade aos antibióticos testados e um índice de multirresistência baixo, enquanto que todas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* evidenciaram multirresistência.

Diante no exposto, percebe-se que 100% das cepas identificadas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram sensíveis aos antibióticos Cefazolina e Aztreonam.

Os resultados desta pesquisa também demonstraram que, a obtenção de leite de qualidade na propriedade rural está intimamente relacionada com as práticas de higiene sanitária na ordenha e manipulação da matéria prima, o que exige a mudança de comportamento do produtor e de seus funcionários.

De um modo geral, verificou-se que os produtores necessitam de um maior apoio em relação assistência técnica, promoção de estímulos à qualidade e formação continuada sobre riscos à saúde advindos da falta de qualidade do produto.

Diante destas observações, a adoção de ações de boas práticas de higienização é de suma importância aos produtores de laticínios de pequeno porte para garantir as melhorias dos queijos comercializados no município de Guaraí – TO como uma ferramenta de qualidade dos produtos e segurança dos consumidores.

Por fim, medidas devem ser adotadas para controle do uso indiscriminado de diversos antibióticos no tratamento terapêutico, evitando o surgimento de bactérias multirresistentes. Além disso, permite rastrear casos de susceptibilidade aos antimicrobianos em queijos artesanais.

REFERÊNCIAS

ARENAS, N. E.; MELO, V. M. Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. **Infectio**, v. 22, n. 2, p. 110-119, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001a. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p.1-54. Brasília: 2001.

DANTAS, D. S.; ARAÚJO, A. M.; SANTOS, J. O.; SOUSA SANTOS, R. M.; RODRIGUES, O. G. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

DAVIS, G. S.; PRICE, L. B. Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 128-135, 2016.

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from artisan Minas cheese from the Serra da Canastra, MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v.33, n.2, p.271- 275, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; FRANÇA SANTOS, G. C.; SANTOS SOUZA J.; SOUSA BERNARDES F.; SILVA, I. P. 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, R. M.; SPINI, J. D. C. M.; CARRAZZA, L. G.; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, p. Art. 1019-1026, 2011.

FONTANETTI, M. M.; GHEDIN G. L.; DEBONI C. N.; GONZALEZ, L. H.; DIAS T. C. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, 2015.

FORSBERG, K. J.; REYES, A.; WANG, B.; SELLECK, E. M.; SOMMER, M. O.; DANTAS, G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1107-1111, 2012.

GARCIA, J. K. S.; PRATES, R. P.; FARIAS, P. K. S.; GONÇALVES, S. F.; SOUZA, C. N. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 58-65, 2016.

GASPAROTTO, P. H. G.; ROCHA, C. S.; GRECELLÉ, C. B. Z. Quantificação de coliformes totais e fecais pela técnica do nmp em amostras de água do município de Jí-Paraná. **Ciência & Consciência**, v. 2, 2008.

GUO, Y.; ZHOU, H.; QIN, L.; PANG, Z.; QIN, T.; REN, H.; ZHOU, J. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153561, 2016.

HLOPE, S. T.; MCKERROW, N. H. Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in a paediatric intensive care unit. **South African Journal of Child Health**, v. 8, n. 4, p. 125-128, 2014.

HU, L.; ZHONG, Q.; TU, J.; XU, Y.; QIN, Z.; PARSONS, C.; ZHANG, B.; HU, X.; WANG, L.; YU, F.; PAN, J. Emergence of bla_{NDM-1} among *Klebsiella pneumoniae* ST15 and novel ST1031 clinical isolates in China. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 4, p. 373-376, 2013.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Guaraí população 2016**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidades>>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

KIRANMAYI, C. B.; KRISHNAIAH, N.; SUBHASHINI, N.; AMARAVATHI, P.; MAHESWARI, M.; RAMYA, P. PCR analysis of mutton and chicken samples for the presence of Shiga toxigenic E. coli. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, 2011.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: Con un estudio de los climas de la tierra. Fondo de Cultura Economia, Mexico-Buenos Aires, 1948.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.

MILANOVIĆ, V.; OSIMANI, A.; AQUILANTI, L.; TAVOLETTI, S.; GAROFALO, C.; POLVERIGIANI, S.; TURRONI, S. Occurrence of antibiotic resistance genes in the fecal DNA of healthy omnivores, ovo-lacto vegetarians and vegans. **Molecular nutrition & food research**, v. 61, n. 9, p. 1601098, 2017.

MOUSSÉ, W.; BABA-MOUSSA, F.; ADJANOHOON, A.; NOUMAVO, P. A.; SINA, H.; ASSOGBA, S.; BABA-MOUSSA, L. Virulence profiles of pathogenic Escherichia coli strains isolated from street foods in Benin. **International Journal of Biotechnology and Food Science**, v. 4, n. 3, p. 52-64, 2016.

NUNES, M. M.; ALENCAR MOTA, A. L. A.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S.; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TEKLEMARIAM, Z.; JAMIL, K. Antimicrobial drug resistance in strains of Escherichia coli isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 341-346, 2014.

RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária – MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 57-61, 2016.

SABIKHI, L., BHONGLE, P. B., SATHISH K. M. H. Farmstead and artisanal cheeses: Adding value to milk at the farmers' doorstep. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 4, 2015.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arq Inst Biol**, v. 73, n. 2, p. 171-5, 2006.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE Microbial quality

of. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

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**. São Paulo.Varela, 3 ed. p. 552, 2007.

SILVA, P.H.C. **Qualidade do leite produzido e beneficiado no Distrito Federal (BRASIL) quanto à adequação à Instrução Normativa nº 51/2002**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, 2010. 81f.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: ArtMed, 2012, 894p.

WOLUPECK, H. L.; ROSSA, H. C. R. L. S.; BIASI, R.; MACEDO, R. E. F. Assessment of the microbiological quality of Minas frescal cheese commercialized in the city of Curitiba, Parana State, Brazil at 10 years' interval (1999 and 2009). **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 10, n. 3, p. 243-252, 2012.

YAO, B.; XIAO, X.; WANG, F.; ZHOU, L.; ZHANG, X.; ZHANG, J. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 107-112, 2015.

ZHANG, S.; YANG, G.; YE, Q.; WU, Q.; ZHANG, J.; HUANG, Y. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 289, 2018.