

INVESTIGAÇÕES MICROBIOLÓGICAS SÔBRE QUEIJOS (*)

ARIOSTO BULLER SOUTO E HELIO MARTINS,

Biologistas do Instituto Adolfo Lutz.

Em trabalho anterior¹ os autôres já tiveram a oportunidade de passar em revista a importância dos microorganismos do grupo coliforme no contrôle sanitário dos produtos de laticínio em geral e da manteiga em particular.

Na presente investigação microbiológica sôbre queijos são analisados particularmente os resultados e os problemas concernentes à flora colibacilar dos mesmos em relação à Saúde Pública. Outros dados microbiológicos obtidos no curso dos exames, relativos à flora estafilocócica e micótica são analisados e discutidos em outras publicações, por um de nós (Martins¹⁵). A presente contribuição ocupa-se particularmente do perigo potencial que representa a presença de germes do grupo coliforme nos queijos entregues ao consumo e da necessidade de se estabelecerem medidas restritivas em relação à matéria. Tal afirmativa é justificada em parte, pelo fato de que em inúmeras amostras de queijos suspeitos de responsáveis por casos de intoxicação alimentar recebidos para exame na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz, não conseguimos isolar senão microorganismos do grupo coliforme. A êste respeito afirma Shrader⁸, comentando um surto de intoxicação causado por queijo, em que as pesquisas bacteriológicas não conseguiram evidenciar a presença de Salmonelas. "These cases are particularly interesting because they are representative of many such outbreaks that are never reported in the literature but are frequently encountered in public-health practice". Observa ainda, que os sintomas são súbitos, aparecem em poucas horas e são caracterizados por náuseas, dor abdominal, pulso rápido, diarréia e prostração, desaparecendo habitualmente após 24 horas.

A correlação existente entre a flora colibacilar de queijos e certas formas de intoxicação alimentar têm sido examinada por diver-

(*) Trabalho apresentado e aprovado pela 1.^a Jornada Brasileira de Bromatologia

soz pesquisadores. Particularmente interessantes são as pesquisas realizadas por Mello e Rogick² sôbre os germes do grupo coliforme entrados no queijo tipo Minas, — o mais consumido no Brasil — em relação à toxi-infecção alimentar. Observaram que “em alguns casos, a inoculação do material (queijo em suspensão homogênea) mesmo por via sub-cutânea, provocou 48 horas após, a morte das cobaias, que apresentavam extenso enfisema dissecante que, do ponto de inoculação, na face interna da coxa, ou terço inferior do abdomen, se irradiava até a região esternal” e que “a sementeira do material colhido na lesão e de sangue do coração revelou cultura pura de germes do grupo *Escherichia-aerobacter*”. Observaram ainda que os queijos examinados (tipo Minas) continham, em média, 114.100 germes do grupo *Escherichia aerobacter* por grama.

Florentin³ analisou cuidadosamente diversos surtos de intoxicação alimentar consequentes à ingestão de queijos. Após observar que a sintomatologia exibida pelos pacientes assemelhava-se àquela da intoxicação por toxinas microbianas, concluiu serem os queijos com elevado teor de colifórmes os responsáveis pela intoxicação. E termina afirmando: “Quoi qu’il en soit, il est quelque peu alarmant de constater que, tandis qu’on prohibe le colibacille dans l’eau, les huitres etc., la consommation de certains fromages conduit a en absorber des quantités considérables, et il apparait que la consommation des fromages colibacillaires n’est pas sans présenter des inconvénients pour l’organisme, ainsi qu’en témoignent les quelques intoxications assez graves que nous avons relatés plus haut”.

Igualmente, Tanner⁴ refere oito surtos de intoxicação por queijos ocorridos em uma povoação do Estado de Michigan, caracterizados por um conjunto dramático de sintomas: vomitos, cólica, diarréia. Pôsto que tais casos não tenham sido completamente elucidados sob o ponto de vista etiológico, os microorganismos do grupo coliforme presentes nos queijos ingeridos, aparecem como prováveis responsáveis por aqueles surtos, em virtude de terem determinado o aparecimento de fenômenos tóxicos em camondongos por meio de substâncias que, com bastante probabilidade, seriam verdadeiras toxinas (Tanner).

Igualmente, Savage e White⁷ analisando cem casos de intoxicação alimentar, referem-se a oito deles como tendo sido desencadeados pela ingestão de queijos.

É interessante observar-se que os sintomas próprios da intoxicação produzida por queijos (diarréia, cólica e náuseas) são idênti-

cos àqueles observados nos distúrbios gastro-intestinais que ocorrem habitualmente após a ingestão de águas poluídas pelo conteúdo dos esgotos, pois conforme afirma Dack⁹: “When water is suddenly contaminated with sewage, cases of diarrhea, abdominal cramping and nausea frequently occur within 12-48 hours”. Dack⁹ exemplifica citando um grave surto epidêmico de enterite referido por Jordan e Irons¹⁰ que acometeu 10.000 habitantes de Rockford cuja água de abastecimento fôra temporariamente poluída pelo conteúdo de esgotos.

Igualmente importantes são os casos de intoxicação alimentar causados pela *E. coli* presentes em outros alimentos. Lodenkämper¹¹, que realizou uma revisão na literatura sôbre o assunto, refere alguns casos de intoxicação devidos à *E. coli* tendo feito a comprovação da toxidez do germe por meio da administração oral e inoculação endoperitoneal, em camundongos, de filtrados de cultura. Igualmente, coliformes do grupo *aerogenes-cloacae* têm sido responsabilizados por surtos de intoxicação alimentar. Particularmente interessante é o caso referido por Gilbert, Coleman e Laviano⁶, de um surto de gastro-enterite afetando 125 pessoas após a ingestão de “bombas” e “eclairs” de chocolate dos quais foi isolado um microorganismo pertencente ao grupo *cloacae-aerogenes* que demonstrou ser tóxico para animais de experiência. Buchanan e Megrail¹ referem igualmente dois surtos de intoxicação alimentar “provavelmente devidos ao *B. cloacae*”. Ao lado das diferentes formas clínicas características da colibacilose, é particularmente interessante, como exemplo do poder patogênico dos coliformes, a diarréia infecciosa do recém-nascido, afecção altamente letal, caracterizada por grave intoxicação e desidratação, clinicamente comparável ao cólera asiático — e que, consoante a autorizada opinião de Parr¹², tem a sua etiologia ligada ao grupo coliforme. Dulaney e Michelson¹³ descrevem um surto de diarréia em recém-nascidos produzidos pelo *B. coli-mutabile*.

A capacidade toxigênica da *E. coli* tem sido analisada por diversos pesquisadores. Vincent demonstrou que a *E. coli* produz duas classes de toxinas: uma de ação sôbre o sistema nervoso (neurotrópica); outra de ação sôbre o intestino (enterotrópica). A inoculação experimental de tais toxinas determina o aparecimento de: 1.º) sintomas nervosos e neuromusculares: paralisias que se iniciam nos membros posteriores atingindo, em seguida, os membros anteriores e acometendo os musculos inervados pelos centros bulbares; 2.º)

sintomas intestinais — enterite aguda, lesões do intestino, congestão intensa, etc.

Pacheco e Xavier demonstraram que a administração repetida, por via digestiva, de filtrados de culturas de *E. coli* a coelhos, determina uma diminuição progressiva de pêso que termina com caquexia e morte do animal.

Mello e Rogick² observaram que, enquanto a maioria das raças de *E. coli* enquadra-se entre as variedades inócuas, outras existem, extremamente virulentas, capazes de, em doses mínimas (1/5, 1/10, 1/15 de alça de cultura), matar cobaias por via peritoneal. Parr¹² aventou a hipótese de que todos os coliformes seriam idôneos para produzir toxinas, ocorrendo contudo, poucas raças capazes de produzi-las em quantidade suficiente para o desencadeamento dos sintomas de intoxicação, ponderando ainda que o adulto normal é relativamente resistente a tais toxinas.

A aparente disparidade estatística entre a grande proporção de queijos (e também de outros alimentos) contendo elevado teor de *E. coli* e os surtos de intoxicações devidos a êsses mesmos queijos, teria sua explicação no grande número de variedades do *B. coli* (*communis*, *communior*, *vulgaris*, *inversus*, *anomalus*, *mutabilis*, *haemoliticus*) e na ocorrência de raças fortemente toxigênicas ao lado de raças atóxicas, o que explica igualmente os sintomas anômalos e díspares da infecção colibacilar.

MÉTODO EMPREGADO

Na presente publicação são analisados os resultados de exames microbiológicos de 147 queijos de diferentes naturezas, realizados na Secção de Contrôles Biológicos do Instituto Adolfo Lutz.

Os principais tipos de queijos analisados foram: tipo Minas, tipo Prato, tipo Parmezon e tipo Provolone.

O método empregado foi o seguinte: Pesam-se 10 gramas do queijo e tritura-se em gral estéril com um pouco de areia, ajuntando em seguida 90 cm³ de água filtrada esterilizada. Fazem-se as diluições subsequentes até 1/100.000. Semeam-se as respectivas diluições em meio de verde brilhante e incuba-se a 37°C por 24-48 horas. Observa-se a produção de gás pelos germes do grupo coliforme. Semeia-se também a diluição 1/10 em meios de Kauffmann e Sabouraud incubando-os respectivamente a 37°C e 28°C. O tempo de incubação para o Sabouraud deve ser prolongado até vários dias.

A contagem bacteriana é feita em placas de agar standard de acôrdo com a técnica seguinte: coloca-se 1 cm³ das diluições (a partir de 1/100) em cada uma das 4 placas de Petri e junta-se o agar, prèviamente fundido e resfriado a 45°C, imprimindo às placas um movimento rotatório afim de misturar completamente o agar com a água de diluição. Incuba-se a 37°C e realizam-se as contagens após 24 horas.

RESULTADOS

No quadro abaixo transcrito estão registrados os resultados obtidos:

Natureza do produto	Total das amostras examinadas			Bactérias		Bactérias + cogumelos (leveduras e bolores)		Grupo coliforme								Estafilococos		Cogumelos		
								E. coli		A. aerogenes		A. cloacae		E. freundii				Total do grupo coliforme		leveduras
	N.	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%	N.	N.	N.		
Queijo	147	24	16,3%	123	83,6%	66	75,2%	13	14,6%	6	6,8%	3	3,4%	88	59,8%	23	112	11		

No coluna III o número e percentagem de amostras que apresentavam desenvolvimento exclusivo de bactérias; na coluna IV, o número e percentagem de amostras nas quais houve desenvolvimento concomitante de bactérias e cogumelos (levedos e bolores); na coluna V, o número e percentagem de amostras em que estiveram presentes os diferentes germes do grupo coliforme; na coluna VI o número de amostras dos quais foram isolados estafilococos; na coluna VII o número e natureza dos cogumelos identificados.

Os microorganismos contaminantes estavam assim distribuídos: em 24 amostras houve desenvolvimento exclusivo de bacilos *Gram*-positivos esporulados e bacilos *Gram*-negativos enquanto que nas restantes 123 observou-se o crescimento concomitante de bacilos e fungos diversos (leveduras e bolores).

Em relação aos microorganismos do grupo coliforme, os exames por nós efetuados atestam a sua presença em 88 amostras ou seja em 59,8% do total de queijos examinados. Dêstes microorganismos, a *E. coli* foi encontrada em 66 amostras; a *E. freundii* em 3 amostras, o *Aerobacter aerogenes* em 13 amostras e o *Aerobacter cloacae* em 6 queijos.

Foram as seguintes as percentagens dos coliformes em relação ao total do grupo: *E. coli* 75,2%, *A. aerogenes* 14,6%, *A. cloace* 6,8% e *E. freundii* 3,4%. Esses resultados obtidos em queijos de diferentes espécies são bastante semelhantes aos encontrados por Mello e Rogick² no exame de queijo tipo Minas: *Escherichia* 75,56%, *Aerobacter* 11,10%, tipos intermediários 13,34%.

Em relação à flora global, obtivemos os seguintes resultados em 71 amostras analisadas:

Abaixo de 1 milhão de germes por grama	2 amostras
De 1 milhão a 10 milhões de germes por grama	8 amostras
De 10 milhões a 20 milhões de germes por grama	7 amostras
De 20 milhões a 30 milhões de germes por grama	3 amostras
Acima de 30 milhões	51 amostras
	—
	71 amostras

Conforme se verifica 71,8% das amostras analisadas apresentam teor microbiológico superior a 30 milhões de germes por grama e 28,2% abaixo de 30 milhões de germes por grama.

Outros microorganismos encontrados foram: estafilococos em 32 amostras, leveduras diversas em 112 amostras e bolores em 11 amostras.

Os elevados teores microbiológicos encontrados e, sobretudo, a elevada percentagem da *E. coli* indicam seguramente a existência de condições insatisfatórias no preparo dos queijos e o uso de leites com elevado teor de coliformes. Conforme demonstraram perfeitamente Mello e Rogick² a maneira mais segura de evitar o desenvolvimento de coliformes no queijo (tipo Minas) é a pasteurização do leite. Assim estariam os consumidores protegidos contra a ingestão de queijos que, de acôrdo com os mesmos autôres, introduzem no organismo humano a média de 114.110 germes do grupo coliforme por grama do produto e seriam evitados os riscos da toxi-infecção alimentar pela *E. coli*.

RESUMO E CONCLUSÕES

1) Empregando métodos adequados de contrôle microbiológico foram examinadas 147 amostras de queijos de diferentes espécies (tipo Minas, tipo Prato, tipo Provolone, tipo Parmezão).

2) Em 88 das amostras examinadas (59,8%) foram encontrados microorganismos do grupo coliforme nas seguintes percentagens em relação ao total do grupo: *E. coli* 75,2%, *A. aerogenes*, 14,6%, *A. cloacae*, 6,8% e *E. freundii*, 3,4%.

3) Em 71 amostras em que foi realizada a contagem da flora global, 20 apresentaram contagens de 0 até 30 milhões de germes por grama (28,2%) enquanto que nas 51 restantes (71,8%) a contagem obtida era superior a 30 milhões de germes por grama.

4) Foram isolados cogumelos em 120 amostras e estafilococos em 32 queijos examinados.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1st. — Adequate methods of microbiological control were employed for the testing of 147 samples of different types of cheses Minas type, Prata type, Provolone type, Parmezan type).

2nd. — 88 of the specimens examined (59,8%) were found to contain microorganisms of the coliform group in the following percentages, given in relation to total amount of the group: *E coli*, 75,2%, *A. aerogenes*, 14,6% *A. cloacae*, 6,8% and *E. freundii*, 3,4%.

3rd. — A total count was made for 71 samples, 20 of which had a count ranging from 0 to 30 million germs per gramme (28,2%), while in the 51 remaining samples (71,8%) the was over 30 million germs per gramme.

4th. — Fungi were obtained from 120 samples and staphylococci from 32 of the cheeses examined.

AGRADECIMENTO

Os Autôres agradecem às Sras. Olga Pupo, Aparecida Moreno Pássaro, às Senhoritas Ema de Lima, Zélia Pujol Gambier, Aparecida Marcondes, Aparecida Carvalhaes, Ymê Amato e ao Sr. Clovis Napoleão pelo eficiente auxílio prestado no desempenho da parte técnica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BUCHANAN, E. B. e MEGRAIL, E. — 1929 — Two outbreaks of food poisoning probably due to *B. cloacae*. *Journ. Inf. Dis.*, 44: 235.
- 2 — MELLO, A. e ROGICK, F. A. — 1940 — A flora colibacilar do queijo tipo Minas e toxi-infecção alimentar. *Rev. Ind. Animal*, 3: 35.

- 3 — FLORENTIN, D. — 1938 — La flore colibacillaire des fromages et les intoxications alimentaires. *Compt. Rend. Acad. Sc.*, 206: 1060.
- 4 — TANNER, F. W. — 1933 — Food-borne infections and intoxications — Twin — City Printing Co., 111.
- 5 — VINCENT, H. — 1925 — Sur l'élimination urinaire du Bacille coli-comunis et sur son origine hématogène. *C. Rend. Soc. Biol.*, 180: 239.
— VINCENT, H. — 1925 — Sur la pluralité des toxines du Bacillus coli et les bases expérimentales de la serumthérapie anticoli bacillaire. *Comp. Rend. Acad. Sc.*, 180: 1624.
— VINCENT, H. — 1928 — Indice toxique des races du Bacillus coli. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 187: 787.
- 6 — GILBERT, R., COLLEMAN, M., LAVIANO, A. B. — 1932 — Food poisoning due to toxic substances formed by strains of the cloacaeerogenes group. *Amer. Journ. Publ. Health*, 22: 721.
- 7 — SAVAGE e WHITE — 1939 — Cit. in Food Control — Its Public Health Aspects — New York — John Wiley and Sons, Inc., 1939.
- 8 — SHRADER, James Houston — 1939 — Food Control — Its Public Health Aspects — New York John Wiley and Sons, Inc.
- 9 — Dack, G. M. — Food poisoning. The University of Chicago Press. Chicago, 111.
- 10 — JORDAN, E. O. e IRONS, E. E. — 1912 — Cit. in Dack-Food Poisoning, *Journ. Inf. Dis.*, 11: 21.
- 11 — LODENKAMPER, H. — 1940 — *Centr. f. Bakt.* (Abt. 1) Orig., 145: 306.
- 12 — PARR, L. W. — 1939 — Coliform Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 3: 1.
- 13 — DULANEY, L. S. e MICHELSON, I. D. — 1935 — A study of *B. coli mutabile* from an outbreak of diarrhea in the new-born. *Am Journ. Publ. Health*, 25: 1241.
- 14 — SOUTO, A. Büller e MARTINS, H. — 1946 — Investigações microbiológicas sobre manteigas (Trabalho apresentado à 1.ª Jornada Brasileira de Bromatologia).
- 15 — MARTINS, H. — Investigações sobre estafilococos isolados de alimentos. (no prelo).
— MARTINS, H. — Investigações sobre a flora micótica de alimentos. (no prelo).