

CONTAMINAÇÃO DO QUIBE CRU, VENDIDO NA ZONA CENTRAL DA CIDADE DE SÃO PAULO, POR MICRORGANISMOS DE ORIGEM FECAL *

SEBASTIAO TIMO IARIA **, JOSÉ CAVALCANTE DE QUEIROZ ***,
GIL VIANNA PAIM *** e DURVAL DE MELLO ****

INTRODUÇÃO

A carne, como disse com muita propriedade Saenz Egana, nasce como alimento quando morre o animal. Os germens patogênicos encontrados na carne podem ser devidos a uma infecção do animal quando ainda em vida ou podem provir de uma contaminação externa, seja por parte de um portador humano, seja do ambiente do próprio matadouro ou ainda no transporte ou nos locais de venda.

Surtos de enterite, cuja responsabilidade foi atribuída à carne, têm sido registrados como bem mostra a farta bibliografia existente sobre o assunto ^{12, 13, 14}. Por outro lado anormalidades anátomo-patológicas facilmente reconhecíveis, tais como emaciação e descoloração, gânglios linfáticos hemorrágicos ou purulentos e a presença de focos ou exsudatos, podem levar um inspetor de carnes à suspeita de salmonelose animal. Entretanto, há os casos de portadores sãos, todos de difícil descoberta e, que dêste modo, passam despercebidos no trabalho de inspeção.

Surtos também têm sido relatados incriminando portadores humanos pela contaminação de alimentos por bactérias patogênicas intestinais ou não. As shigelas são essencialmente agentes patogênicos intestinais do homem e a identificação de um germe dêste gênero em um alimento permite que se admita que sua origem seja as fezes de um doente ou de um portador.

No que concerne à contaminação por parte do ambiente, há na bibliografia especializada, estudos bastante demonstrativos, os quais revelam o papel importante que desempenham os utensílios usados em matadouros,

Recebido para publicação em 17-5-1965.

* Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dácio de Almeida Christovão) e da Cadeira de Parasitologia Aplicada e Higiene Rural (Prof. José de Oliveira Coutinho) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da U.S.P. Apresentado na Sessão de 5-4-65, do Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina.

** Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas.

*** Instrutores da Cadeira de Parasitologia Aplicada e Higiene Rural.

**** Médico-Veterinário do Instituto Biológico.

bem como as roupas e mão dos manipuladores, nesses estabelecimentos". Por outro lado, é também patente o papel que ratos, moscas e baratas podem desempenhar na veiculação e na disseminação de germens. Assim, é evidente que ao se concluir as operações de matança, as carcaças levam consigo para as câmaras frias certo número de bactérias que depende das condições sanitárias do matadouro.

Retiradas das câmaras frias para serem enviadas ao consumo permanecem essas carcaças ainda por algum tempo, embora bastante resfriadas, em ambiente favorável no que diz respeito a receberem novas cargas bacterianas. Isto se processa quando as carcaças aguardam o momento do embarque para serem transportadas ao tendal e daí para os açougues.

Nos açougues, o problema se torna mais complexo pois nem sempre possuem câmaras frias com capacidade suficiente para poder armazenar tôdas as carcaças recebidas e assim elas permanecem expostas durante muito tempo, às vêzes, até que sejam retalhadas para serem vendidas. Aqui nota-se com freqüência a exposição de quantidades apreciáveis de carne sobre os seus balcões e nos suportes. Há de se mencionar, além disto, as manipulações das carnes nos restaurantes e bares.

Tendo presente as facilidades de contaminação da carne, os autores levaram à efeito o presente trabalho com o intuito de contribuir para o conhecimento do grau de contaminação do "quibe cru", tal como é entregue ao consumo público na zona central da cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente procedemos ao levantamento dos locais de venda de quibe na zona central da cidade de São Paulo. Dentre os inúmeros existentes, foram selecionados 19 nos quais o quibe era servido cru, ou seja, sem qualquer cocção durante o seu preparo.

A coleta da amostra obedeceu ao seguinte critério: na posição de consumidores, adquiriríamos de cada estabelecimento 2 quibes na noite anterior ao dia do exame e estes eram mantidos em geladeira, na embalagem original fornecida pelo próprio vendedor. Na manhã seguinte eram levados ao laboratório, onde chegavam ainda frios, e imediatamente procedia-se ao início do exame.

Preparo da amostra — De cada local de venda eram comprados 2 quibes e eles constituíam uma única amostra a ser examinada. Em um liquidificador colocavam-se 10 gramas de material das partes interna e externa de cada quibe. Adicionavam-se em seguida 180 ml de água fosfatada gelada, estéril e a mistura era liquidificada durante 3 minutos. A partir desta emulsão a 1/10, eram preparadas duas séries de diluições

decimais, indo de 1/100 a 1/1.000.000 para as posteriores determinações dos NMP de bactérias coliformes, *E. coli* em especial e de enterococos, usando-se como diluente água fosfatada estéril.

Grupo coliforme — De cada diluição foram semeados 3 tubos de caldo lactosado simples sem tubo de Durham, cada um com 1 ml, e em seguida eram incubados a 35°C durante 24 horas. Após a incubação, de cada tubo que apresentava qualquer turvação, era feita a passagem em placas de ágar eosina azul de metileno de Levine (Difco) e estas incubadas a 35°C durante 24 horas. No dia seguinte, de todas as placas que apresentavam crescimento de colônias com as características das bactérias do grupo coliforme, isolava-se uma colônia (de preferência típica de *E. coli*) e esta era semeada em caldo lactosado com tubo de Durham e em ágar simples inclinado. Os primeiros eram incubados a 35°C por 24 a 48 horas e os últimos por 24 horas. A bactéria inoculada era considerada como pertencente ao grupo coliforme quando o tubo de caldo lactosado revelava a presença de gás e o esfregaço feito a partir do ágar inclinado apresentasse bacilos gram-negativos não esporulados.

E. coli — Dos tubos de caldo lactosado sem tubo de Durham inoculados que apresentavam qualquer turvação, após a incubação a 35°C por 24 horas, fizeram-se repiques em caldo lactose-ácido bórico³ com tubo de Durham e estes eram incubados a 43°C, em estufa, por 24 a 48 horas. Uma primeira leitura era realizada após 24 horas e as culturas que revelavam a presença de gás, eram passadas em placa de ágar eosina-azul de metileno de Levine (Difco). As que não revelavam a presença de gás eram incubadas por mais 24 horas. Se após esse tempo revelavam a presença de gás, eram semeadas em placas de eosina azul de metileno, no caso contrário, eram desprezadas.

As placas de eosina azul de metileno eram incubadas a 35°C durante 24 horas e, em seguida, de todas elas procurava-se pescar uma colônia típica de *E. coli* e esta era semeada em caldo lactosado com tubo de Durham e em ágar simples inclinado. Finalmente, havendo produção de gás e em se tratando de bacilos gram-negativos não esporulados, partindo-se das culturas em ágar simples semeavam-se os meios usados para as provas de Voges Proskauer e do aproveitamento do citrato (ViC). Considerava-se a bactéria inoculada como sendo *E. coli* quando ambas as provas eram negativas.

Nas técnicas usadas na pesquisa de coliformes e *E. coli* relatadas não foi feita prova de presunção. Poderia ter sido realizada em caldo lactose bile-verde brilhante² com tubo de Durham. Usamos nas inoculações iniciais tubos de caldo lactosado sem tubo invertido apenas como meio de enriquecimento de coliformes. Quando apresentavam turvação após 24 ho-

ras a 35°C, dava-se o prosseguimento à pesquisa de coliformes e *E. coli* usando as técnicas padrões.

Grupo de enterococos — De cada diluição eram inoculados 3 tubos de caldo presuntivo para enterococos (Difco)⁸ com 1 ml respectivamente. Após 48 horas a 45°C, dos tubos com prova de presunção positiva (turvação e viragem do azul para o amarelo) faziam-se repiques para tubos com meios combinados líquido e sólido para confirmação de enterococo (Difco)⁸ incubando-os a 45°C por 48 horas. Eram consideradas provas de confirmação positiva aquelas cujos tubos, com meio confirmativo, apresentavam crescimento no fundo da parte líquida, colônias pequenas na superfície da parte inclinada e ao exame microscópico revelavam em esfregaços, cocos gram-positivos em cadeias.

Os cálculos dos NMP em todos os casos foram feitos após as provas finais para cada um dos grupos de bactérias pesquisadas, usando-se a tabela de NMP para 3 tubos por volume inoculado¹.

Para cada amostra, foram determinados dois NMP/g de coliforme, *E. coli* em particular e de enterococos, correspondentes às duas séries de diluições decimais. Estabeleceram-se em seguida as médias aritmética e geométrica para cada amostra.

Salmonelas e Shigelas — Partindo da emulsão a 1/10, fizeram-se semeaduras diretas em placas de ágar eosina azul de metileno de Levine (Difco), ágar ácido rosólico, ágar SS (Difco) e meio de Wilson & Blair (Difco). Por outro lado, 1 ml da emulsão era semeada em caldo tetratio-nato e após a incubação de 20 horas a 35°C, procedeu-se a passagem em placas de eosina azul de metileno, ágar SS, ágar verde brilhante e meio de Wilson & Blair. Os resultados finais foram considerados após as identificações bioquímica e sorológica das colônias isoladas.

RESULTADOS OBTIDOS

Das 19 amostras de quibe cru examinadas, 2 (10,5%) revelaram resultado positivo para bactérias patogênicas intestinais. Assim de uma amostra foi isolada *Salmonella schotmuelleri* e de outra *Shigella flexneri* 3.

Na determinação dos NMP de coliformes, *E. coli* e enterococos, obtiveram-se resultados compreendidos respectivamente entre 175 e > 1.100.000, < 30 e 166.500, e < 30 e > 110.000, por grama de quibe.

Por outro lado, as médias aritmética e geométrica dos NMP/g nas 19 amostras foram, respectivamente, para coliformes > 156.187 e > 28.861 e para *E. coli* < 14.017 e < 1.080; com relação a enterococos, as médias aritmética e geométrica dos NMP/g em 15 amostras investigadas, foram respectivamente > 26.856 e > 2.258.

Os números de coliformes obtidos nas várias amostras foram muito maiores do que os de *E. coli*, fato que pode ser explicado pela maior frequência de bactérias coliformes não fecais no meio ambiente, em relação às de origem fecal.

Na tabela, pode-se verificar a distribuição dos NMP/g das duas séries de exames de cada amostra de quibe cru, e as respectivas médias aritmética e geometria parciais e gerais para coliformes, *E. coli* e enterococos.

Na referida tabela não constam os NMP/g para enterococos relativos às amostras A, B, C e D pelo fato de terem sido seus exames prejudicados.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados indicaram em nossas amostras grande variação do número daquelas bactérias consideradas como índices de poluição fecal.

Comparando-se os valores dos NMP/g das várias bactérias pesquisadas, verifica-se que para as amostras de A a L são, em média, maiores que para as de M a X. Esta ocorrência provavelmente relaciona-se com as épocas em que as amostras foram colhidas, pois as de A a L foram coletadas no mês de fevereiro (verão) e as de M a X em agosto (inverno). Apesar disto, porém, as amostras T e X revelaram resultados relativamente altos em relação as demais colhidas durante o inverno; por outro lado, a amostra G, coletada no verão, apresentou valores baixos em relação as demais examinadas na mesma época.

Segundo Tanner¹⁸, os métodos bacteriológicos, nos exames de rotina têm várias limitações, dadas as inúmeras possibilidades que tem a carne em ganhar bactérias nas diversas fases da sua manipulação.

Paim¹², fazendo uma revisão deste assunto reúne as opiniões de vários autores sobre as dificuldades de se estabelecer padrões bacteriológicos para carnes frescas, fato que se estende a outros alimentos.

Vários pesquisadores, porém, têm proposto padrões. Hobbs¹⁰ propõe padrões para carne crua, baseados na contagem padrão em placas com incubações feitas a 22°C e 37°C. Propõe ainda a exigência de ausência de coliformes fecais em 0,01 g, de salmonelas em 50 g e de estafilococos com prova de coagulase positiva em 0,01 g.

O Essex County Health Department¹¹ baseado em estudo feito em estabelecimentos de 3 categorias relata os resultados insatisfatórios obtidos e propõe padrões bacteriológicos gerais para carnes cozidas baseados em contagem em placas a 37°C e 22°C e ainda que coliformes, estafilococos com prova de coagulase positiva, salmonelas, *Cl. welchii* e *Cl. botulinum*, não devam estar presentes em determinadas quantidades de alimento.

Mossel e Butiaux⁴, no simpósio sobre problemas da análise microbiológica de alimentos, propuseram também padrões para definir a qualidade de alimentos frescos obtidos por fermentação microbiana ou não, para alimentos semi-preservados, para os em conserva e pouco ácidos e para os enlatados estéreis.

Dêstes padrões citados, podemos comparar os nossos resultados com os valores propostos por Hobbs para carne crua com relação a coliformes fecais.

Assim, 15 das nossas amostras revelaram a presença de *E. coli* em 0,01 g e duas não apresentaram essa bactéria nesta porção. Nas duas restantes não foi examinada a porção de 0,01 g e sim partiu-se de 0,001 g, não se revelando a presença de *E. coli* nesta quantidade; a quantidade de 0,01 g poderia fornecer resultado positivo ou negativo. Portanto, estariam dentro do padrão proposto por Hobbs, com relação a *E. coli*, no máximo 4 (21%) das 19 amostras examinadas.

Nas amostras *G* e *H* os NMP/g de *E. coli* são relativamente baixos em relação aos de várias outras amostras e, no entanto, pudemos isolar bactérias patogênicas intestinais com relativa facilidade.

Poder-se-ia supor que essas contaminações foram devidas a manipuladores, muito embora a *S. schottmuelleri* possa ser encontrada também em algumas espécies de animais como bovinos, e ovinos, mais raramente⁵. É claro que esta afirmação só poderia ser definitiva se tivessem sido feitas, também coproculturas dos manipuladores que atuaram naquela carne em tôdas as suas fases de preparo.

Entre inúmeras pesquisas referentes ao assunto, podemos citar a de Smith¹⁷, que pesquisando salmonelas em gânglios linfáticos de porcos, obteve resultado positivo em 60 (12%) dos 500 animais examinados; a de Cruz⁷, em Costa Rica, que examinando carne moída vendida, para o consumo, em açougues de São José e Barba, a primeira, a capital e a segunda, localidade rural, isolou de 434 amostras, 43 cêpas de salmonelas, compreendendo 10 sorotipos diferentes e 1 de *Shigella boydii*.

Entre nós Rangel Pestana e Rugai¹⁶ obtiveram 15% de resultados positivos para Salmonelas, em gânglios mesentéricos de porcos abatidos no matadouro municipal de São Paulo; Lucas Assumpção³, também de São Paulo, examinando bacteriológicamente carnes e seus produtos obteve isolamento de salmonelas em 10,6% e 19% de materiais de origem bovina e suína, respectivamente, num total de 153 exames.

Nas 19 amostras por nós examinadas, obtivemos o isolamento de *S. schottmuelleri* e *Sh. flexneri* 3.

É evidente que diante dêstes fatos não é aconselhável o consumo de carne crua, pois ela representa um perigo potencial no que se refere a infecções intestinais.

Com relação às técnicas por nós usadas para as determinações de coliformes e *E. coli*, embora não possamos compará-las com métodos padrões, pois não era este o escopo desta investigação, pudemos fazer algumas observações de natureza prática. Assim, verificamos que calculando-se o NMP/g de coliformes, a partir dos resultados obtidos nas placas de EAM e na prova completa, as médias geométricas respectivas foram > 31.214 e > 28.861 . Assim se se considerasse apenas o primeiro resultado, o erro seria de 7,9%. Portanto se se aceitar este erro como sendo relativamente baixo, na pesquisa de coliformes poderíamos calcular o NMP já a partir dos resultados das placas de EAM, não havendo a necessidade de se realizar a prova completa, o que traria uma economia de tempo e de material num exame de rotina.

Para a *E. coli*, porém, verificamos que a incubação do caldo lactose ácido bórico deve ser feita até 48 horas a 35°C, para a verificação da presença de gás, e que há ainda a necessidade do exame a ser realizado até as provas de IMViC.

As médias geométricas dos NMP/g de *E. coli* para as 19 amostras, a partir dos resultados obtidos em caldo lactose-ácido-bórico, nas placas de EAM, na prova completa e após as provas de V.P. e citrato foram, respectivamente, < 2.252 , < 1.880 , < 1.763 e < 1.080 . Esses valores não nos permitem estimativa da eficiência relativa das diferentes fases do método bacteriológico empregado. Entretanto, se tomarmos os valores 2.252, 1.880, 1.763 e 1.080 como as médias geométricas referidas, o resultado considerado após as provas de V.P. e citrato mostraria redução do NMP/g de 52% em relação ao do caldo lactose ácido bórico, de 42,5% em relação ao da prova de confirmação em EAM e de 38,7% em relação ao da prova completa.

Assim, verificamos que com relação ao quibe cru, a seletividade do caldo lactose-ácido-bórico, incubado a 43°C, não se revelou alta nesta investigação, quando se consideram os resultados em termos de NMP de *E. coli*, pois se observou considerável redução de 52%, levando-se o exame até as provas de V.P. e citrato (ViC).

Considerando-se porém os resultados em termos de porções positivas, como habitualmente se faz, a seletividade do caldo lactose ácido bórico se mostrou maior. Assim observamos que de 251 tubos de caldo lactose-ácido-bórico revelando produção de gás, 243 (96,8%) se confirmaram em EAM, 241 (96,1%) na prova completa e 216 (86,1%) nas provas de V.P. e citrato. Verifica-se, assim, após as provas de V.P. e citrato, uma percentagem de falsos positivos de 13,9%. Esta percentagem ainda poderia ser julgada como indicando seletividade aceitável do caldo lactose-ácido-bórico quando usado exclusivamente, mas não se deverá esquecer que só o número de bactérias reveladas pode dar idéia da eficiência do processo.

CONCLUSÕES

1. Das 19 amostras de quibe cru examinadas, 2 (10,5%) revelaram resultado positivo para bactérias patogênicas intestinais. De uma delas se isolou *Salmonella schottmuelleri* e de outra, *Shigella flexneri* 3.
2. Os NMP/g de bactérias coliformes, *E. coli* e enterococos estiveram compreendidos respectivamente entre 175 e > 1.100.000, < 30 e 166.500 e < 30 e > 110.000.
3. As médias aritméticas e geométrica dos NMP/g nas 19 amostras foram, respectivamente para coliformes > 156.187 e > 28.861 e para *E. coli* < 14.017 e < 1.080.
4. As médias aritmética e geométrica dos NMP/g de enterococos em 15 amostras foram, respectivamente, > 26.844 e > 2.258.
5. Em relação a *E. coli* os valores obtidos indicaram que apenas 4 amostras (21%), no máximo, estariam dentro dos limites propostos por Hobbs.
6. O quibe entregue cru ao consumo público, pode representar risco de infecção intestinal, como ficou demonstrado pelos resultados desta investigação.

RESUMO

Foram examinadas amostras de quibe provenientes de 19 locais de venda da zona central da cidade de São Paulo, que forneciam tal produto cru para o consumo público. Nessas amostras foram pesquisadas salmonelas, shigelas e determinados os NMP/g de bactérias coliformes e *E. coli* em dezenove e também enterococos em quinze. Os números elevados encontrados de coliformes e, principalmente, de *E. coli* e enterococos revelaram que o quibe fornecido cru ao consumo público pode representar risco de infecção intestinal.

SUMMARY

Samples of raw kibe from 19 shops in the central zone of the city of São Paulo were examined. These were examined for *Salmonella* and *Shigella* and NMP/g of coliformes and *E. coli* was determined in 19 and of enterococci in 15. The high values encountered especially for coliformes and *E. coli* and enterococci, showed that kibe sold raw to the public can present a risk of intestinal infection.

IARIA, S. T.; QUEIROZ, J. C. de; PAIM, G. V. & MELLO, D. de. Contaminação do quibe cru, vendido na zona central da cidade de São Paulo, por microrganismos de origem fecal. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, **19**:111-121, 1965.

AGRADECIMENTO

Aos técnicos Rosa Frederico de Carvalho, Maria Augusta dos Santos e José Moraes de Godoy, do Departamento de Microbiologia e Imunologia Aplicadas, que nos prestaram valioso auxílio técnico na execução deste trabalho, o nosso reconhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, New York. Standard methods for the examination of water and wastewater. 11th ed. New York, 1960. 626 p.
2. ——— Sanitation indexes. (*In* — Recommended methods for the Microbiological Examination of Foods. New York [c 1958]. p. 132-147).
3. ——— Appendix A-Culture media. *Ibid.*, p. 165-191.
4. APPLEMAN, M. D. Symposium on problems in the microbiological analysis of foods. *Bact. Rev.*, **21**(4):241-244, Dec. 1957.
5. ASSUMPÇÃO, L. Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* em carnes e seus derivados vendidos a retalho. *Arq. Hig. (S. Paulo)*, **11**(29):473-486, set. 1946.
6. BREED, R. S. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957. 1094 p.
7. CRUZ, E. De La et al. Salmonelas en la carne de consumo molida. *Bol. Of. sanit. panamer.*, **56**(3):226-231, mar. 1964.
8. DIFCO MANUAL of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th ed. Michigan, Difco Laboratories, [1953]. 350 p.
9. FRAZIER, W. C. *Food microbiology*. New York, McGraw-Hill, 1958. 472 p.
10. HOBBS, B. C. Bacteriology as applied to imported foods. *Sanitarian*, **68**(2):156-162, Nov. 1959.
11. HUGHES, H. L. An investigation of the bacteriological condition of cooked meats as sold to the public. *Sanitarian*, **68**(4):216-224, Jan. 1960.
12. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Higiene de la carne. Ginebra, 1959. 557 p. (Ser. monogr. n.º 33).
13. ———. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Higiene de la carne: primer informe. Ginebra, 1955. 56 p. (Ser. Inf. techn., n.º 99).
14. ———. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Higiene de la carne: segundo informe. Ginebra, 1963. 98 p. (Ser. Inf. techn., n.º 241).
15. PAIM, G. V. Dificuldades para se estabelecer um padrão bacteriológico para o controle sanitário de carne fresca. *Biológico*, **28**(9):253-257, set. 1962.
16. PESTANA, R. B. & RUGAI, E. O porco normal como portador de salmonelas. *Rev. Inst. A. Lutz*, **3**(2):232-235, dez. 1943.
17. SMITH, H. W. The isolation of salmonellae from the mesenteric lymph nodes and faeces of pigs, cattle, sheep, dogs and cats and from other organs of poultry. *J. Hyg. (London)*, **57**(3):266-273, 1959.
18. TANNER, F. W. *The Microbiology of foods*. 2th ed. Michigan, Difco Laboratories [1953]. 350 p.