

Cultura, Crescimento e Identificação de Bactérias do Gênero *Staphylococcus aureus* em Leite de Cabra

Introdução

O leite de cabra é um alimento que fornece importantes nutrientes para a alimentação humana. Quando produzido sem os cuidados necessários pode ser capaz de permitir o desenvolvimento de interferentes indesejáveis, como microrganismos patogênicos. Tais problemas causam grandes prejuízos aos produtores (bactérias causadoras da mastite causam diminuição na produção de leite), a indústria (diminuição do rendimento e sabor desagradável nos produtos) e aos consumidores (doenças transmitidas por alimentos – DTAs).

A qualidade do produto inicia-se na produção primária e depende da adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) em todas as etapas de produção. Tais medidas visam garantir a higiene, a segurança e a qualidade do produto, além de incluir cuidados com a saúde dos trabalhadores envolvidos na produção. O estado sanitário do rebanho, a higiene do ordenhador e as condições das instalações e dos equipamentos são alguns dos fatores que afetam a qualidade higiênico-sanitária do leite, permitindo a presença ou não de microrganismos no produto final.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é um microrganismo classificado como coco Gram positivo, ananeróbico facultativo; é uma bactéria não móvel e também catalase e coagulase positiva. As células são esféricas e aparecem sozinhas ou pareadas, ou apresentam formações semelhantes a cachos de uva. A parede celular é resistente a lisozima é sensível a lisoestafina, a qual especificamente lisa as pontes de pentaglicina de *Staphylococcus* spp. Algumas cepas de *S. aureus* estão aptas à produzir enterotoxinas estafilocócicas (SEs), agentes responsáveis por intoxicações alimentares estafilocócicas. *S. aureus* não formam esporos. Desta forma a contaminação pode ser prontamente evitada pelo tratamento através do calor. Contudo, este passo permanece como sendo a maior causa de DTA, pois pode acarretar na contaminação de produtos alimentares durante o preparo e o processamento. *Staphylococcus aureus* é encontrado nas narinas, na pele e pêlos de animais de sangue quente. Mais de 30-50% da população humana é portadora natural dessa bactéria.

Staphylococcus aureus é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura (7 a 48,5°C com uma temperatura ótima de 30 a 37°C; SCHIMITT et al., 1990), pH (4,2 até 9,3 com ótimo entre 7 a 7,5; BERGDOLL, 1989) e em altas concentrações de cloreto de sódio (acima de 15% de NaCl). Estas características permitem ao *S. aureus* crescer em uma grande variedade de alimentos e somadas ao seu habitat, podem facilmente explicar sua incidência em alimentos que requerem manipulação durante o processamento, incluindo produtos alimentícios fermentados, tais como queijos. A avaliação do risco em alimentos baseia-se na clássica detecção e quantificação microbiana de estafilococos coagulase positivos em meio seletivo Baird-Parker, o qual possui composição padronizada. A sensibilidade destes métodos de rotina gira em torno de 10² UFC/mL para alimentos sólidos e 10 UFC/mL para os líquidos (LE LOIR et al., 2003). Os diferentes meios utilizados para a detecção e quantificação de *S. aureus* têm sido revisados por Baird & Lee (1995). Em muitos países, baixos níveis de contaminação por *S. aureus* são tolerados em vários alimentos (acima de 10³ UFC/mL em queijos feitos a partir de leite cru, por exemplo, na França), sendo que estes, não são considerados como risco para saúde pública.

On line

Sobral, CE
Dezembro, 2009

Autores

Lea Chapaval

Méd. Vet., D. Sc.;
Pesquisadora da Embrapa
Caprinos e Ovinos. Estrada
Sobral/Groaíras, Km 04 -
Zona Rural - Cx Postal 145 -
CEP: 62010-970 - Sobral/CE
lea@cnpq.embrapa.br

Valdanya Mara Pereira Aguiar

Graduada de Biologia
Universidade Estadual Vale
do Acaraú

Ana Paula Brandão de Sousa

Bióloga, Pós-graduanda em
Vigilância Sanitária
Faculdade INTA

Kesley Pereira de Miranda

Graduando de Medicina
Veterinária
Faculdades INTA

Alan Martins Mororó

Zootec.,
Pós-graduando em Vigilância
Sanitária, Faculdades INTA,
Bolsista Embrapa Caprinos
e Ovinos.

Daniele Cristina Timbó Magalhães

Méd. Vet., Pós-graduanda em
Saúde Pública, Faculdades
INTA

Coleta do Leite

As amostras de leite devem ser coletadas em recipientes apropriados, limpos e esterilizados, conforme o tipo de exame a ser realizado e devem ser enviadas ao laboratório em isopor contendo gelo, com temperatura em torno de 4°C. As amostras de leite devem ser representativas do volume total de leite que se pretende avaliar, por exemplo, para a coleta de leite em animais individualmente deve-se obter uma amostra de 50 mL dos dois meios mamários.

Acondicionamento e Armazenagem das Amostras de Leite no Laboratório

Ao chegar ao laboratório as amostras devem ser transferidas para freezer no intuito de manter a temperatura entre 2 e 4°C.

Material Requerido Para Análise

Preparação das Amostras e Diluições Seriadas

- Diluente- água peptonada
- Tubos de diluição com 9 (nove) mL de água peptonada
- Pipetas automáticas de 1 (um) mL

Contagem Direta em Placas

- Placas com Ágar Baird-Parker (BP)
- Estufa incubadora regulada a 35-37°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Tubos com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)
- Reagentes para coloração de Gram
- Óleo mineral estéril
- Coagulase Plasma-EDTA
- Peróxido de Hidrogênio 3%
- Solução Salina 0,85%

- Estufa incubadora regulada a 35-37°C com termômetro calibrado.
- Placas ou lâminas com Ágar Azul de Toluidina DNA.
- Ágar Dnase Teste Base sem DNA
- DNA
- Azul de bromotimol
- Manitol

Procedimentos de Laboratório

Preparação das Amostras e Diluições Seriadas

A preparação das amostras para análise envolve a retirada de uma unidade analítica que seja representativa do conteúdo da amostra de leite e a preparação das diluições decimais seriadas. Utilizar água peptonada que é um diluente para homogeneização e diluição de amostras para análise e transferir 9 (nove) mL para cada tubo.

No caso de alimentos líquidos (leite) transferir asépticamente a unidade analítica (1 mL) diretamente para os tubos contendo 9 (nove) mL de diluente (Água Peptonada). Antes de retirar o volume a ser transferido, agitar vigorosamente o tubo manualmente ou com auxílio de um agitador tipo "vortex". Para obter diluições subsequentes proceder transferindo 1 (um) mL da diluição anterior para 9 (nove) mL de diluente.

Contagem Direta em Placas

Preparação das Placas

Para o plaqueamento em superfície as placas devem ser previamente preparadas, com 15 a 20 mL do meio de acordo com o grupo de microorganismos que se objetiva contar. No caso do *Staphylococcus aureus* o meio mais amplamente utilizado é o Ágar Baird-Parker (BP), no entanto este não é capaz de suprimir completamente o crescimento de competidores do *S. aureus*, outras espécies não patogênicas do gênero *Staphylococcus* podem crescer, produzindo colônias semelhantes, havendo a necessidade de submeter às colônias típicas ao teste de coagulase para confirmação.

Inoculação

Selecionar três diluições adequadas da amostra. Inocular 0,1 mL de cada diluição na superfície de placas com Ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secas. Espalhar o inóculo com alça de Drigalski, das placas de maior diluição para as de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido.

Incubação

Aguardar que as placas sequem completamente e incubar invertidas a 35 °C por 48 horas.

Contagem das Colônias Presuntivas

Selecionar para a contagem as placas com 20 a 200 colônias. Contar apenas as colônias típicas de *S. aureus* que são circulares pretas ou cinza escura, com 2-3 cm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, com massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca (Fig. 1). Eventualmente, colônias atípicas podem se apresentar cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, contar separadamente e anotar o resultado.



Fig. 1. Placa de Petri com colônias típicas de *S. aureus*.

Confirmação das Colônias Típicas

Selecionar no mínimo cinco colônias típicas para o teste de coagulase, havendo menos de cinco, tomar todas. Se a placa apresentar colônias suspeitas, típicas e atípicas, selecionar pelo menos cinco de cada tipo, ou um número proporcional a distribuição dos diferentes tipos na placa. Transferir cada colônia para tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI).

Coloração de Gram

Emulsionar uma alçada de uma colônia típica de *S. aureus* em uma gota de solução salina numa lâmina de vidro, em seguida secar a lâmina usando a chama de um bico de bunsen.

Procedimento de coloração

1. Cobrir a lâmina com Cristal Violeta e deixar agir por 1 minuto.
2. Sem lavar a lâmina, adicionar Lugol, deixando agir por 1 minuto.
3. Ainda sem lavar proceder à descoloração com álcool acetona por no máximo 5 segundos, até que a coloração violeta não se desprenda mais da lâmina.
4. Enxaguar imediatamente com água destilada.
5. Adicionar Fucsina e deixar agir por 20 segundos.
6. Enxaguar em água destilada.
7. Deixar secar e observar em objetiva de imersão (100x).

A coloração de Gram é uma técnica que cora os microrganismos com base na integridade e na composição química da parede celular. De acordo com a cor adquirida, roxo ou rosa, as bactérias são consideradas Gram positivas ou Gram negativas, respectivamente. *Staphylococcus aureus* são tipicamente Gram positivas (Fig. 2).

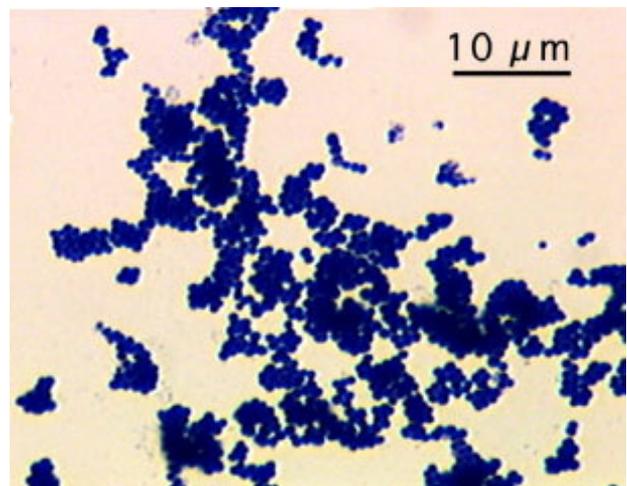


Fig. 2. Colônias de *S. aureus* Gram positivas.

Catalase

Emulsionar uma alçada de uma colônia típica de *S. aureus* em uma gota de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) em uma lâmina de vidro (Fig. 3). Observar a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas de *S. aureus* são catalase positivas.

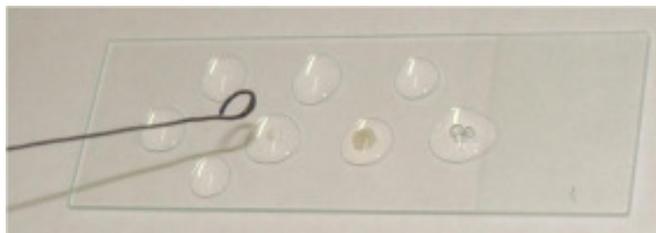


Fig. 3. Teste de Catalase.

Coagulase

Transferir 3 mL de cada cultura obtida em BHI, para um tubo estéril em seguida adicionar 3 mL de Coagulase plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Misturar com movimentos de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação. Incubar a 35-37°C e observar ao final de seis horas se há formação de coágulo firme que não se rompe quando o tubo é virado para baixo (Fig. 4). Quando ocorre a coagulação, considera-se teste de coagulase positivo.

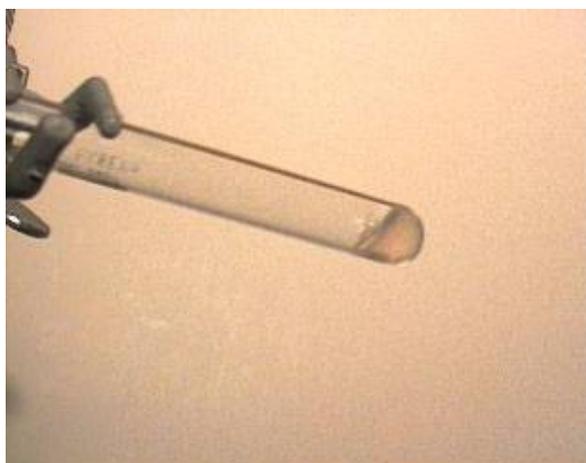


Fig. 4. Teste de Coagulase: após a formação de coágulo.

Termonuclease

A partir do caldo BHI, transferir uma porção da cultura para um tubo estéril e ferver em banho-maria por 15 minutos. Inocular a cultura fervida e resfriada nos orifícios previamente preparados em lâminas de Agar Azul de Toluidina DNA. Usar uma das perfurações para uma cepa padrão termonuclease positiva e a outra para uma cepa padrão termonuclease negativa.

Colocar as lâminas dentro de placas de Petri recobertas com papel filtro umidificado e selar as placas com fita crepe. Incubar a 35-37°C – 4h ou 50°C – 2h e observar após a incubação se há formação de um halo róseo (Fig. 5). Se o halo estender-se por cerca de 1 mm ao redor das perfurações inoculadas, considera-se teste positivo, na ausência do halo indica teste negativo.



Fig. 5. Teste de Termonuclease: Formação de halo róseo ao redor do inoculo.

DNase

O Ágar Dnase Teste Base sem DNA é usado pela detecção da atividade da desoxirribonuclease de bactérias e fungos e particularmente da identificação de *Staphylococcus* patogênicos.

Dissolver 40 gramas em 1000 mL de água destilada em seguida adicionar 2 gramas de DNA, 0.025 gramas de azul de bromotimol e 10 gramas de manitol. Ferver para dissolver o meio completamente. Esterilizar autoclavando entre 12 e 15 lbs de pressão entre 118 e 121°C por 15 minutos. Resfriar até 45°C e despejar em placas de Petri estéreis.

Avaliação de Resultados (Fig. 6):

Características da cultura depois de 18-24 horas a 35-37°C.

Organismos(ATCC)	Crescimento	Atividade da DNase
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abundante	+

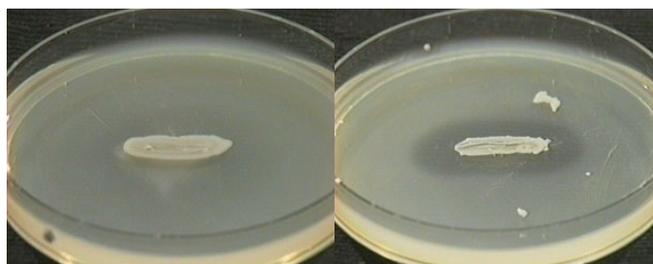


Fig. 6. Atividade da DNase positiva.

Referências

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*.

International Journal Food Microbiology, v. 26, p. 15-24, 1995.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463-523. (Food science and technology, 31).

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 1, p. 63-76, jan., 2003.

SCHMIDT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production on of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 11, p. 1-19, 1990.

Literatura Recomendada

BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N. de; FARIA, C. G. de; MORAES, L. C. D. **Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias**.

Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007. 7 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 92.).

CHAPAVAL, L.. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigenicos via PCR**. 2003. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba.

OLIVINDO, C. S. **Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR em sequências palindrônicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha**. 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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. 552 p.

STREITFELD, M. M.; HOFFMAN, E. M.; JANKLOW, H. M. Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 84, p. 77, 1962.

WECKMAN, B. G.; CATLIN, W. B. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources, **Journal of Bacteriology**, v. 73, p. 747, 1957.

Circular Técnica, 41 On line

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpc.embrapa.br

SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

On line (Dezembro/2009)

Comitê de publicações

Presidente: *Lúcia Helena Sider.*

Secretário-Executivo: *Diônes Oliveira Santos.*

Membros: *Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Verônica Maria Vasconcelos Freire, Fernando Henrique M. A. R. Albuquerque, Jorge Luís de Sales Farias, Mônica Matoso Campanha e Leandro Silva Oliveira.*

Expediente

Supervisão editorial: *Alexandre César Silva Marinho.*

Revisão de texto: *Carlos José Mendes Vasconcelos.*

Normalização bibliográfica: *Tânia Maria Chaves Campelo.*

Editoração eletrônica: *Cópias & Cores.*