



ANAIS

**VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE
MICROBIOLOGIA APLICADA
&
II ENCONTRO
LATINO-AMERICANO DE
MICROBIOLOGIA APLICADA**

Porto Alegre, 5 a 8 Novembro, 2012



ISSN 2237-1672

PPGMAA

Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente – UFRGS

Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Rua Sarmiento Leite, 500 Sala: 052
Porto Alegre - RS - Brasil
CEP: 90050-170
Fone: (0xx51)3308.3788

e-mail: simposiomicro@gmail.com

[031] AVALIAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM ALIMENTOS

MAJOLO, Cláudia¹; SOUZA, Joice da Rocha²; FRODER, Hans³; MUNIZ, Aleksander Westphal¹.

¹ Embrapa Amazônia Ocidental, claudiamajolo@hotmail.com

² UNIVATES – Centro Universitário, jdarochasouza@yahoo.com.br

³ SFDK Laboratório de Análise de Produtos LTDA, hfroder@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Staphylococcus são uma das principais causas de um amplo e diversificado número de doenças como: síndrome do choque tóxico, febres e intoxicações alimentares, acreditando-se que, estas doenças, na maioria, são causadas por toxinas liberadas por estes micro-organismos nos alimentos¹.

A doença transmitida por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é uma intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação celular. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas. A ingestão de uma dose menor que 1 µg pode provocar os sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10⁶ UFC/g de alimento. A presença dessa alta população de *S. aureus* nos alimentos pode revelar condições de higiene e/ou sanitização precárias, no entanto, não é uma evidência suficiente para justificar a contaminação de um alimento².

A fim de detectar e diminuir os riscos de contaminação de alimentos por *Staphylococcus* faz-se necessário o desenvolvimento de métodos sensíveis e precisos para detecção desse patógeno. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar métodos rápidos para a quantificação de *S. aureus* em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras para avaliação de contaminação por *S. aureus* foram coletadas de produtos alimentícios (cárneos e lácteos) em diferentes estabelecimentos comerciais do estado do Rio Grande do Sul. As 77 amostras obtidas durante o período de junho a novembro de 2010 foram preparadas conforme a INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 62 DO MAPA (IN nº 62).

A inoculação foi realizada conforme os métodos: ABP (Ágar-Baird-Parker), conforme preconizado pela IN nº 62, placas 3M™ PETRIFILM™ Staph Express e Compact Dry X-SA. No método ABP a inoculação utilizou 0,1 mL de cada diluição em placas de ágar-Baird-Parker. Esse inóculo foi espalhado sobre a placa com auxílio de alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas a 36 ± 1°C por um período entre 30 e 48 h. Já as placas de 3M™ PETRIFILM™ Staph Express e Compact Dry X-SA foram inoculadas com 1 mL de cada diluição e foram incubadas a 36 °C ± 1°C por 24 h. Para todos os métodos foram utilizadas três placas por diluição.

A leitura do método ABP foi realizada através da avaliação do intervalo para contagem de 20 e 200 colônias. Foram contadas as colônias típicas (negras brilhantes com presença de dois

halos: opaco e claro) e atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos). Em seguida, foram selecionadas três colônias de cada tipo, que foram inoculadas em tubos contendo 7 mL de caldo-cérebro-coração (BHI). Esses tubos foram incubados a foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 0,3 mL por tubo para re-inoculação em tubos contendo plasma de coelho. Os tubos reinoculados foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 h. No final desse período foi verificada a presença de coágulos firmes indicando a contaminação por *S. aureus*.

As placas de 3M™ PETRIFILM™ Staph Express foram inoculadas com 1 mL das diluições usadas conforme descrito no preparo das amostras. Após, foi efetuada a leitura prévia das placas, e às que apresentaram crescimento, foram adicionados os discos reativos de termonuclease. As placas foram reincubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 h. Transcorrido o período de incubação, foi efetuada a contagem, considerando-se colônias vermelhas ou azuis rodeadas por uma área rosada como positivas para *S. aureus* conforme indicado pela 3M MICROBIOLOGIA.

As placas de Compact Dry X-SA foram inoculadas com 1 mL das diluições usadas conforme descrito no preparo das amostras e foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Transcorrido o período de incubação, foi efetuada a contagem, considerando-se colônias azuis como positivas para *S. aureus* conforme indicado pelo fornecedor VERUS MADASA.

TESTE DE LINEARIDADE

A linearidade dos métodos alternativos, 3M™ PETRIFILM™ Staph Express e Compact Dry X-SA, foi avaliada quanto à capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do alvo (a partir da fase estacionária contendo uma população de 10^6 UFC/mL). A determinação da fase estacionária foi realizada utilizando a cultura *overnight* da cepa de *S. aureus* (ATCC nº2593).

Diluições decimais seriais da suspensão celular foram preparadas em água peptonada salina 0,1% estéril até a variação de oito unidades logarítmicas. Para a determinação da população de *S. aureus*, porções de 1 mL das diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} foram inoculados superficialmente no ágar padrão para a contagem (PCA) (Oxoid Ltd. Basingstoke, England). As placas contendo o ágar PCA foram incubadas a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h. Este procedimento foi realizado em duplicata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de t de Student ($p < 0,05$).

O teste de linearidade aplicado aos métodos testados utilizou a seguinte fórmula:

$$G_{n-1}^2 = 2 \left[c_1 \ln \frac{c_1}{R_1} + c_2 \ln \frac{c_2}{R_2} + \dots + c_n \ln \frac{c_n}{R_n} - (\sum c) \ln \left(\frac{\sum c}{\sum R} \right) \right]$$

onde G^2 corresponde ao índice de dispersão; C corresponde a soma (\sum) das leituras nas 3 placas de um mesmo nível; e R corresponde ao volume relativo em cada nível (VR)³. O valor de G obtido foi comparado com o valor do Chi-quadrado (χ^2) tabelado com graus de linearidade n-1 e 0,1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 77 amostras que foram analisadas durante o período de junho a novembro de 2010, constatou-se que não existe diferença estatística entre os métodos 3M™ PETRIFILM™ Staph Express e Compact Dry X-SA e método tradicional (IN nº 62) ($P > 0,05$).

Estes resultados corroboram com outro estudo realizado por TASSINARI e colaboradores em 2006⁴, onde 80% das amostras apresentaram resultados equivalentes para o método 3M™ PETRIFILM™ Staph Express em comparação com ao método FDA – BAM utilizando ágar Baird Parker.

Já outro estudo⁵, foi observada divergência significativa entre o método tradicional (IN nº62) e o sistema Petrifilm® RSA em 62 amostras alimentícias analisadas em 2002. Deve-se ressaltar que neste estudo o tipo de petrifilm utilizado difere do empregado no presente estudo, impedindo sua direta comparação.

Na avaliação de linearidade para o método 3M™ PETRIFILM™ Staph Express o valor do índice de dispersão (G^2_{n-1}) encontrado foi 3,765

O valor de G (3,765), comparado ao valor de Chi-quadrado $\chi^2_{9-1} = 26,125$ com graus de liberdade n-1 e 0,1% comprova que há linearidade dos resultados, ($3,765 < 26,125$) pois os valores apresentam-se abaixo do valor teórico tabelado para graus de liberdade n-1 e 0,1%, revelando que não houve dispersão dos valores encontrados e que a linearidade dos resultados é satisfatória.

Qualquer método pode ser avaliado quanto a linearidade observando-se a partir dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito. O coeficiente de correlação linear (R^2) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada a reta. Conforme Fig.1 pode-se observar que o valor de coeficiente $R^2 = 0,999$ está muito próximo de 1, podendo ser confirmado que o método 3M™ PETRIFILM™ Staph Express é livre de tendências.

Para o ensaio de linearidade do método alternativo Compact Dry X-SA o valor do índice de dispersão (G^2_{n-1}) encontrado foi 4,986.

O valor de G (4,986) comparado ao valor de Chi-quadrado $\chi^2_{9-1} = 26,125$ com graus de liberdade n-1 e 0,1% comprova que há linearidade dos resultados, ($4,986 < 26,125$) pois os valores apresentam-se abaixo do valor teórico tabelado para graus de liberdade n-1 e 0,1%, revelando que não houve dispersão dos valores encontrados e que a linearidade dos resultados é satisfatória assim como a metodologia anteriormente citada.

Conforme Fig.2 pode-se observar que a linearidade do método Compact Dry X- SA possui valor de coeficiente $R^2 = 0,99$ muito próximo de 1, podendo ser confirmado que este método também é livre de tendências.

FIGURAS E TABELAS:

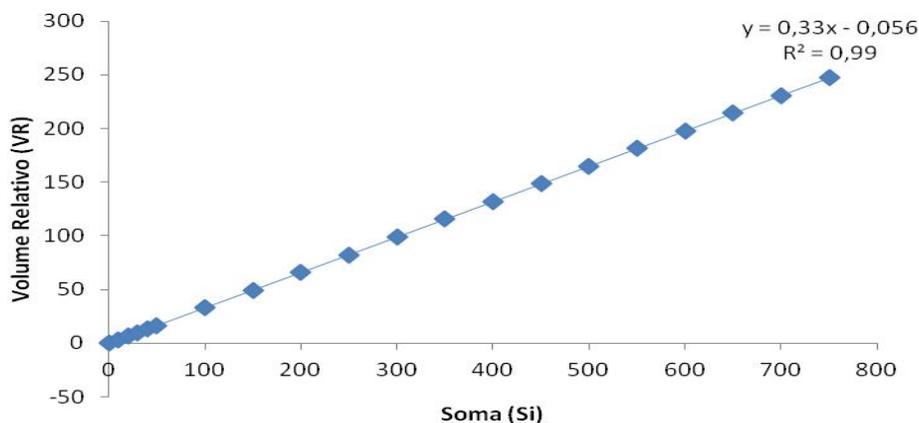


Figura 1: Coeficiente de correlação linear (R^2) e linha de tendência para método de quantificação 3M™ PETRIFILM™ Staph Express. Linha contínua de tendência do método.

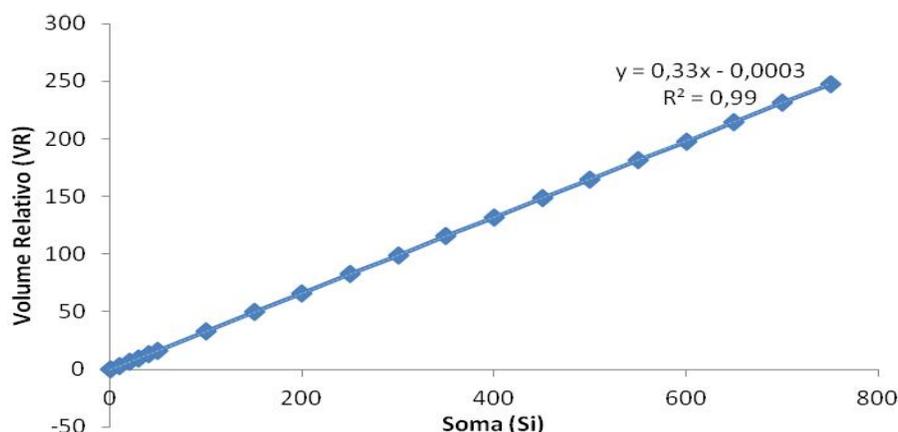


Figura 2: Coeficiente de correlação linear (R^2) e linha de tendência para método de quantificação Compact Dry X - SA. Linha contínua de tendência do método.

CONCLUSÕES

A partir do estudo concluiu-se que os métodos alternativos 3M™ PETRIFILM™ Staph Express, Compact Dry X- SA e o método tradicional (IN nº62) não revelaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$) quando as diluições foram comparadas, o que comprova a equivalência entre os métodos.

Quanto a avaliação de linearidade, percebeu-se que os resultados obtidos para $G < 26,125$ indicam a proporcionalidade de quantificação de diferentes diluições em ambos os métodos alternativos, o que pode ser visualizado conforme Fig.1 e Fig. 2.

Mediante as conclusões supracitadas, fica clara a aplicabilidade dos métodos alternativos testados, como alternativas rápidas, seguras e eficientes na quantificação de *Staphylococcus aureus* em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WILIAMS, R.J. WARD, J.M. HENDERSON, B. POOLE, S. O'HARA, B.P. WILSON, M. NAIR, SP. Identification of a Novel Gene Cluster Encoding Staphylococcal Exotoxin-Like Proteins: Characterization of the Prototypic Gene and Its Protein Product, SET1. *Infection and Imunity*, v. 68, n. 8, p. 4407-4415, 2000.
- [2] BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalManualBAM/UCM071429>. Acesso em: 11 Abril 2011.
- [3] ISO/TR 13843:2000. Water quality - Guidance on validation of microbiological methods, p.47.
- [4] TASSINARI, AR. NODA PK. FRANCO, GM. Express evaluation: An evaluation of 3M Petrifilm Staph Express Count System for enumerating coagulase-positive *Staphylococcus*. *Food Quality magazine* dez/jan, 2006.
- [5] SANT'ANA, A.S.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, 2005.