

**Disciplina: Tecnologia de Produtos de Origem Animal – VNP 3101**

Professor Responsável: Marcos Veiga dos Santos ([mveiga@usp.br](mailto:mveiga@usp.br))

**Aula prática: Análise microbiológica de alimentos**

**1) Introdução**

As análises microbiológicas dos alimentos permitem avaliar:

- I. a eficiência do processo tecnológico aplicado;
- II. as condições de conservação dos alimentos;
- III. as possíveis contaminações no processo;
- IV. o prazo de validade e o tempo de vida útil de prateleira do produto;
- V. a matéria prima para a fabricação de derivados; e
- VI. possíveis riscos à saúde do consumidor.

**2) Preparo da amostra (diluições seriadas)**

É necessário realizar diluições seriadas com o intuito de se obter placas que permitam a enumeração das unidades formadoras de colônias.

<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada 0,1% estéril</li> <li>• Pipetas de 1 ou 2 ml esterilizadas</li> </ul>
<b>Procedimento:</b> (ex.: leite pasteurizado):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homogeneizar o produto na própria embalagem</li> <li>• Fazer a assepsia na parte externa com solução de álcool 70%</li> <li>• Transferir 1 ml da amostra para um tubo contendo 9 ml de solução de água peptonada 0,1% (<b>diluição 10<sup>-1</sup></b>)</li> <li>• Homogeneizar por 3 a 5 vezes coletando 1 ml da diluição 10<sup>-1</sup> transferindo para outro tubo contendo 9 ml de solução de água peptonada a 0,1% (<b>diluição 10<sup>-2</sup></b>), procedendo assim, quantas vezes forem necessárias para obter diluições viáveis.</li> </ul>

**3) Contagem total de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos**

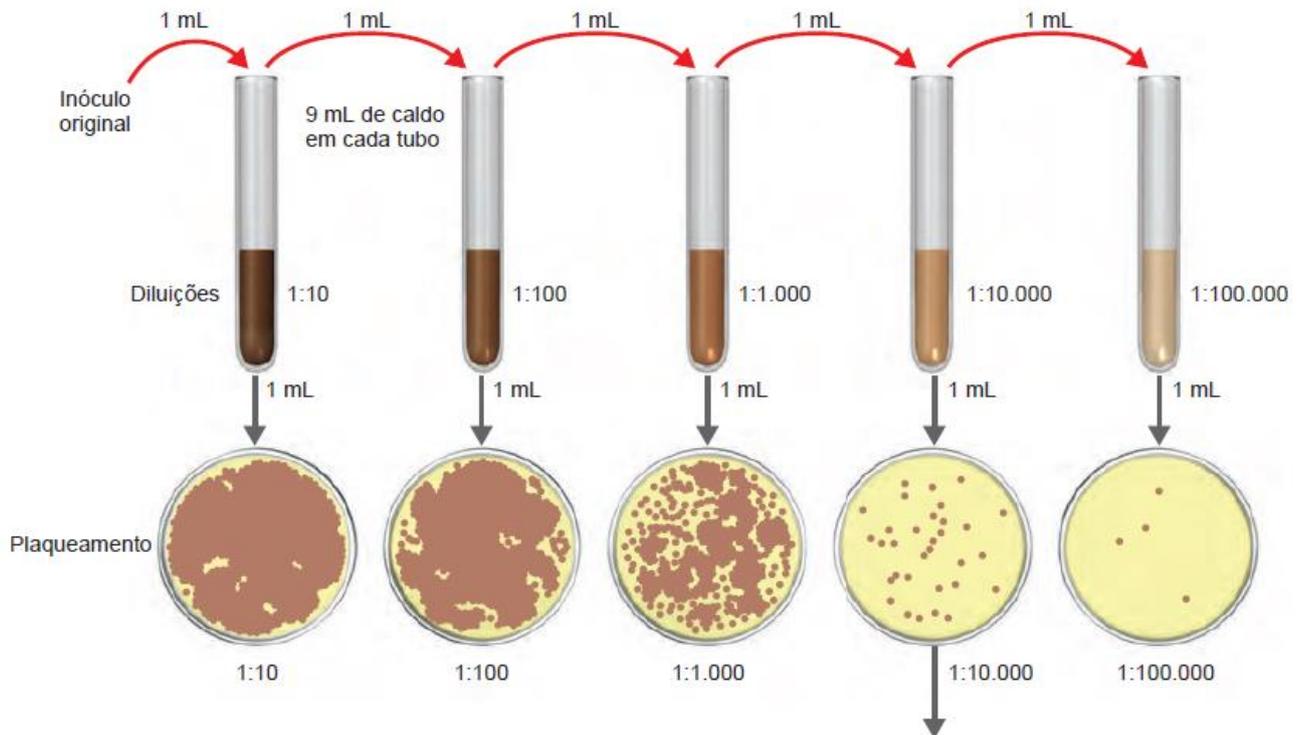
A técnica de contagem em placa permite a visualização da formação de colônias a partir de células viáveis, obtendo assim a contagem total das unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na amostra. De forma geral, os resultados da contagem total **indicam o nível geral de higiene durante a produção, fabricação, condições de armazenamento e transporte do alimento em questão.**

A contagem padrão em placas **não indica a origem da contaminação, nem as causas das possíveis falhas higiênicas.** Neste caso, deve-se realizar a contagem de grupos específicos de microrganismos com meios seletivos.

Principais microrganismos mesófilos do leite:		
<p><i>Micrococcus, Staphylococcus, Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> de origem fecal <i>Streptococcus</i> lácticos</p>	<p><b>Bacilos Gram (+)</b> <i>Microbacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Kurthia</i> <i>Bacillus</i></p>	<p><b>Bacilos Gram (-)</b> <i>Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Enterobacter, Klebsiella, Aerobacter, Escherichia, Serratia</i> <i>Alcaligenes</i></p>
<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placas de petri esterilizadas</li> <li>• Pipetas graduadas de 1 ml esterilizadas</li> <li>• Meio de cultura: ágar padrão para contagem (PCA)</li> </ul>	

**Procedimento:**

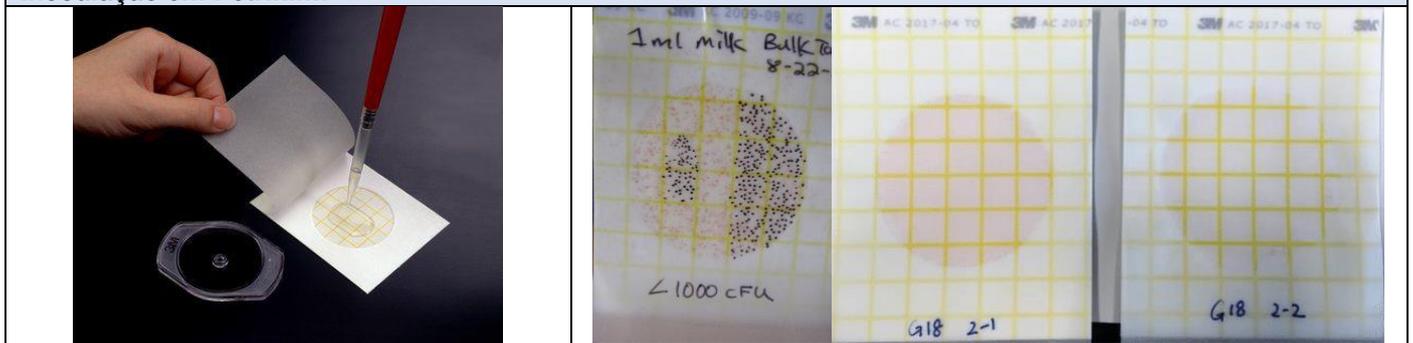
- Selecionar o tempo de incubação de acordo com o tipo de micro-organismo desejado:
  - ▶ Mesófilos: 35°C x 48 h / ▶ Termófilos: 55°C x 48 h / ▶ Psicotróficos: 7 a 10°C x 7 a 10 dias



**Cálculo:** número de colônias na placa x índice de diluição da amostra = número de bactérias/mL (p. ex., se 32 colônias estão na placa de diluição 1:10.000, a contagem pode ser estimada em  $32 \times 10.000 = 320.000$  bactérias/mL na amostra).

**Teste confirmativo:**

**Inoculação em Petrifilm:**



Limites de contagem bacteriana total do leite cru	
Tipo de leite de consumo <sup>a</sup>	Nº máximo de UFC/ml
A	<1x10 <sup>4</sup>
Cru refrigerado	<3x10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Fonte: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

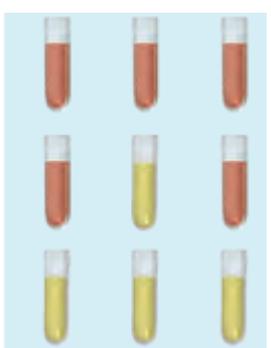
#### 4) Determinação do NMP (número mais provável) de coliformes

##### 4.1) NMP de Coliformes Totais:

O grupo dos coliformes totais inclui os bastonetes Gram (-), aeróbios ou anaeróbios facultativos, que fermentam a lactose com produção de gás em 48 h a 35° C. O grupo dos coliformes inclui tanto bactérias de origem do trato gastrointestinal quanto outros gêneros de bactérias não entéricas (*Serratia*, *Aeromonas*). Desta forma, a sua enumeração é menos representativa de contaminação fecal do que a enumeração de coliformes fecais e *E. coli*. No entanto, a presença de coliformes totais é indicativa das condições de higiene durante o processamento dos alimentos.

<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>9 Tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo lauril sulfato de sódio com tubo de fermentação invertido (tubo de Durhan)</li> <li>Pipetas de 1 ml estéril</li> </ul>
<b>Procedimento:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Semear, assepticamente, cada diluição (1 ml, 0,1 ml e 0,01 ml) para cada série de 3 tubos contendo o meio de cultura</li> <li>Incubar a 35°C por 48 horas</li> <li>Fazer a leitura verificando a formação de gás no tubo de fermentação</li> </ul>

Série de tubos após inoculação	Nº de tubos +
1ml	3
0,1ml	2
0,01ml	0



**Série de diluições do método do número mais provável (NMP).** Neste exemplo, são apresentados três grupos de tubos, cada grupo contendo três tubos. Existiam bactérias o suficiente na amostra para que todos os três tubos do primeiro grupo apresentassem crescimento bacteriano, sendo considerados positivos. No segundo grupo, que recebeu somente um décimo do inóculo inicial, apenas dois tubos foram positivos. No terceiro grupo, que recebeu um centésimo do inóculo inicial, nenhum tubo foi positivo.

**A tabela do NMP permite calcular para uma amostra o número de micro-organismo que estatisticamente são os mais prováveis.** O número de tubos positivos é anotado para cada grupo: no exemplo, os tubos 3, 2 e 0. Se levarmos essa combinação para a tabela do NMP, concluiremos que o índice é 9,3 NMP/mL.

Tabela para determinação do NMP de coliformes em alíquotas de 1,0 (10<sup>0</sup>), 0,1 (10<sup>-1</sup>) e 0,01 (10<sup>-2</sup>) ml de amostra em cada tubo.

Nº de tubos positivos				NMP/ml	Nº de tubos positivos			
1,0ml	0,1ml	0,01ml	NMP/ml		1,0ml	0,1ml	0,01ml	NMP/ml
0	0	0	0,0	2	0	0	0,91	
0	0	1	0,3	2	0	1	1,4	
0	0	2	0,6	2	0	2	2,0	
0	0	3	0,9	2	0	3	2,6	
0	1	0	0,3	2	1	0	1,5	
0	1	1	0,61	2	1	1	2,0	
0	1	2	0,92	2	1	2	2,7	
0	1	3	1,2	2	1	3	3,4	
0	2	0	0,62	2	2	0	2,1	
0	2	1	0,93	2	2	1	2,8	
0	2	2	1,2	2	2	2	3,5	
0	2	3	1,6	2	2	3	4,2	
0	3	0	0,94	2	3	0	2,9	
0	3	1	1,3	2	3	1	3,6	
0	3	2	1,6	2	3	2	4,4	
0	3	3	1,9	2	3	3	5,3	
1	0	0	0,36	3	0	0	2,3	
1	0	1	0,72	3	0	1	3,9	
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4	
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5	
1	1	0	0,73	3	1	0	4,3	
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5	
1	1	2	1,5	3	1	2	12,0	
1	1	3	1,9	3	1	3	16,0	
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3	
1	2	1	1,5	3	2	1	15,0	
1	2	2	2,0	3	2	2	21,0	
1	2	3	2,4	3	2	3	29,0	
1	3	0	1,6	3	3	0	24,0	
1	3	1	2,0	3	3	1	46,0	
1	3	2	2,4	3	3	2	110,0	
1	3	3	2,9	3	3	3	>110,0	

**4.2) NMP de Coliformes Fecais:**

O termo coliforme fecal não tem valor taxionômico, pois apenas indica a presença de microrganismos de origem fecal. A definição dos coliformes fecais é a mesma dos coliformes totais, com diferença de que os coliformes fecais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 h a 45° C. Esta definição objetivou selecionar principalmente os coliformes de origem do trato gastrointestinal. No entanto, dos três principais gêneros deste grupo (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*), pelo menos dois (*Enterobacter*, *Klebsiella*) podem ser de origem não-fecal. Neste caso, a indicação de contaminação fecal ocorre pela enumeração de *E. coli*, a qual é a mais conhecida e facilmente diferenciada dos demais membros não fecais.

<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo verde bile brilhante (VBBL) e lactose a 2%, com tubo de fermentação invertido (tubo de Durham)</li> <li>• Alça de platina</li> </ul>
<b>Procedimento:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Com auxílio da alça de platina, inocular uma alíquota de cada tubo positivo da análise de NMP de coliformes totais em um tubo contendo caldo verde bile brilhante lactose 2% estéril</li> <li>• Incubar a 45°C por 24 a 48 h</li> <li>• Verificar os tubos positivos (com formação de gás e com turvação do meio)</li> <li>• Estimar o NMP de coliformes fecais de forma similar ao descrito no item 4.1</li> </ul>

**Teste confirmativo:**

<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alça de platina</li> <li>• Placas de petri contendo 15 ml de agar eosina azul de metileno (EAM) solidificado estéril</li> </ul>
<b>Procedimento:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ A partir dos tubos positivos obtidos no caldo VBBL, semeie com a alça de platina, estriando nas placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EAM) solidificado</li> <li>○ Incube as placas em estufa a 35°C por 24 h</li> </ul>

Método de inoculação: profundidade e superfície	Inoculação (procedimento):	
		<p><b>Método de esgotamento</b> utilizado para isolar culturas puras de bactérias.</p> <p>As setas indicam a direção da semeadura por esgotamento.</p>
		<p>Após a incubação, verifique a presença de colônias típicas próprias para o grupo coliforme (<i>E.coli</i>) em meio EAM (colônias bem isoladas, de 2-3 mm de diâmetro, centro escuro e brilho metálico esverdeado).</p>

Limites de Enterobacteriaceae (UFC/mL) por tipo <sup>a</sup> de leite	
Leite pasteurizado	n = 5; c = 2; m <1; M = 5
Leite pasteurizado tipo A (pasteurizado)	

n= nº amostras analisadas, c = nº amostras com valores entre m e M, m = padrão da amostra, e M = limite de tolerância.

<sup>a</sup> Fonte: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018

### 5) Cultura na fazenda (placas tripartidas contendo meios cromogênicos):

Os meios de cultura cromogênicos fornecem um método rápido e preciso para isolar e enumerar os microrganismos alvo com base na detecção de atividades enzimáticas específicas. O uso destes meios permite uma detecção mais rápida de microrganismos específicos em comparação com os meios de cultura clássicos, mas também melhora a sensibilidade e pode reduzir a necessidade de testes de subcultura ou confirmação.

O diagnóstico microbiológico de mastite nas fazendas leiteiras tem como objetivo ser um método de resultado rápido e preciso, auxiliando na tomada de decisões principalmente do uso de antibiótico terapia ou não no tratamento de mastite clínica. **O principal objetivo da cultura na fazenda é a rápida tomada de decisão, tanto para tratamento quanto para casos específicos de mastite subclínica.**

### 6) Detecção de resíduos no leite:

Os antimicrobianos são utilizados em quantidades terapêuticas para prevenção e tratamento de doenças dos animais. São substâncias químicas (naturais ou sintéticas) que matam ou inibem o crescimento de microrganismos. As principais vias de aplicação dos antimicrobianos incluem: intramamária, intravenosa, intramuscular, oral e tópica (local). **Após o uso do antimicrobiano, ele é metabolizado e excretado no leite por tempo variável, em todos os quartos mamários e não somente no tratado. Cada antimicrobiano tem um período de carência descrito na bula, que deve ser seguido rigorosamente para envio do leite para o tanque.**

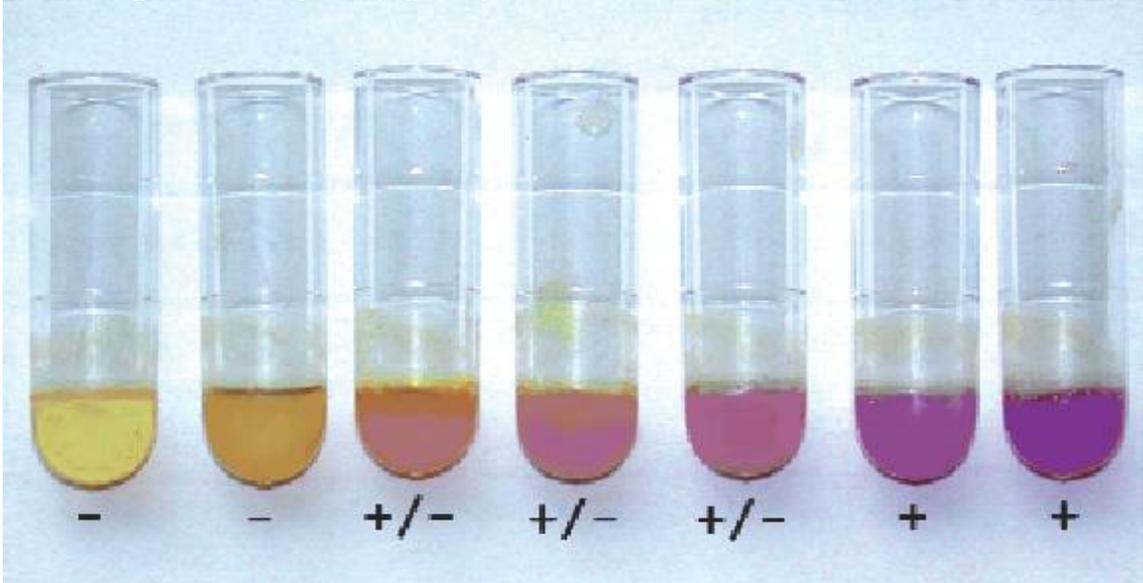
Pelo fato do leite e derivados lácteos serem essenciais para crianças, atenção tem que ser dada sobre os riscos da presença de resíduos destas drogas nestes alimentos. Os resíduos de antimicrobianos apresentam resistência térmica (pasteurização e tratamento ultra alta temperatura). Por esta razão, recomenda-se a monitorização frequente de resíduos de antimicrobianos no leite, adotando-se, como referência, os limites estabelecidos pelas agências internacionais. Por isso, **os resíduos de antimicrobianos no leite devem ser levados em consideração pelas seguintes razões: a) possível impacto na emergência de resistência antimicrobiana frente aos medicamentos utilizados na terapia humana; b) distúrbios da microbiota intestinal; c) possível ocorrência de sintomas alérgicos e d) inibem bactérias lácticas, comprometendo o processamento tecnológico de leites fermentados e de queijos.**

**O monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite é feito por meio de testes de triagem (qualitativos) e de confirmação (quantitativos).** No Brasil, a partir de cada compartimento do caminhão ou carreta, é coletada uma amostra e submetida aos testes, chamados de triagem. No caso de resultado negativo, é feito o descarregamento do leite para processamento na indústria de laticínios. **Quando é detectado resíduo por estes testes de triagem, o leite é descartado** e é feito o rastreamento para identificar a origem da contaminação (leite do tanque refrigerador/propriedade). O monitoramento do leite pode ser feito em amostras de leite individual de vacas tratadas ou do tanque refrigerador.

#### 6.1 Delvotest®

**Princípio do teste:** O método do Delvotest baseia-se no princípio da multiplicação do microrganismo, resultando em diminuição do pH do leite e na modificação de cor do indicador. Este método é composto por ampolas contendo esporos do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, nutrientes e indicador de pH (púrpura de bromocresol). A interpretação é feita a partir da observação da coloração, sendo considerado positivo, quando não for observado o desenvolvimento do microrganismo, permanecendo, portanto, a cor violácea-púrpura. Ou seja, se o leite apresenta resíduos de antibióticos, não ocorrerá multiplicação microbiana na ampola, o que não irá alterar o pH e a coloração do fluido. Já este teste é caracterizado como negativo quando a solução adquirir coloração amarela, indicando, portanto, a ocorrência de desenvolvimento de microrganismos, já que a modificação de cor do indicador decorre da redução do valor de pH.

<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipeta descartável de volume único ~0,1 mL (acompanha o kit de análise)</li> <li>• Ampolas do Delvotest contendo <i>Bacillus stearothermophilus</i></li> <li>• Incubadora (12 v 20 watts) 64° C ou banho maria</li> </ul>
------------------	--

<p><b>Procedimento</b></p>	<p>a) Coletar uma amostra de leite homogênea e representativa do tanque de resfriamento (da fazenda, do caminhão ou do tanque de resfriamento da indústria).</p> <p>b) Preencha com leite a pipeta descartável de volume único (item 1 da seção Material utilizado no kit Delvotest).</p> <p>c) Adicionar nas ampolas do Delvotest (item 2 da seção Material utilizado no kit Delvotest) todo o leite contido na pipeta do kit.</p> <p>d) Coloque as ampolas já com o leite em um incubador (item 3 da seção Material utilizado no kit Delvotest) com temperatura entre 63,5° C e 64,5° C por 3:00 horas.</p> <p>e) Faça a leitura e expresse o resultado em negativo ou positivo para presença de resíduos de antibióticos no leite.</p>
<p><b>Interpretação</b></p>	<p>Após 3:00 horas de incubação, retire as ampolas da incubadora e avalie a coloração da amostra. A ausência de mudança de cor do indicador (cor roxa) mostra que o <i>Bacillus stearothermophilus</i> não se multiplicou devido à presença de inibidores e o resultado é considerado positivo. A mudança parcial da coloração indica um resultado suspeito e a viragem total de roxo para amarelo indica a negatividade da prova (Figura 1), isto é, a amostra estava livre de inibidores.</p>  <p>Figura 1 – Interpretação do resultado de análise do Delvotest® para determinação da presença de resíduos de antibióticos no leite.</p>

Sensibilidade do Delvotest® T (Fonte: DELVOTEST®. Manual de Operações. DSM Food Specialties B. V. 2017

<https://bemconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2021/04/sensitivity-list-master-record-delvotest-t-mrl-eu-portuguese-b-865759.pdf>

Classe de antibiótico	Antibiótico	MRL (EU)	CCβ* (ppb)		Classe de antibiótico	Antibiótico	MRL (EU)	CCβ* (ppb)	
			Ampolas	Placas				Ampolas	Placas
Penicilinas	Amoxicillin	4	4	4	Aminoglicosidas	Neomycin	1500	60	110
	Ampicillin	4	4	3		Gentamycin	100	65	80
	Penicillin G	4	1-2	1-2		Kanamycin	150	1010	1310
	Cloxacillin	30	6	5		DHStreptomycin	200	500	800
	Oxacillin	30	3	3		Spectinomycin	200	2010	1850
Tetraciclina	Oxytetracycline	100	100	80	Cefalosporinas	Cephapirin	60	6	5
	Chlortetracycline	100	150	152		Ceftiofur (pur)*	100	20	20
	Tetracycline	100	70	75		Cefoperazone	50	40	40
	Doxycycline	(0)	50	40		Cefalexin	100	30	20
Sulfonamidas	Sulfamethazine	100	135	150	Cefquinome	20	40	40	
	Sulfathiazole	100	40	30	Outros	Chloramphenicol	(0)	4100	3080
	Sulfadimethoxine	100	40	40		Trimethoprim	50	110	130
	Sulfadiazine	100	40	50		Dapsone	0	30	35
Macrólidos	Tilmicosin	50	60	60	*O Ceftiofur com metabolitos tem um limite de detecção cerca de 4 vezes maior.				
	Tylosin	50	35	35	*CCβ (capacidade de detecção) é a concentração mais baixa onde a substância pode ser detectada 95% do tempo.				
	Erythromycin	40	160	150					
	Lincomycin	150	220	180					
	Rifaximin	60	40	30					

## REFERÊNCIAS:

1. Cerqueira, M.M.O.P. Manual: Uso responsável de antimicrobianos na produção de leite. MSD Saúde Animal
2. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. Publicado em: 30/11/2018 | Edição: 230 | Seção: 1 | Página: 9.
3. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. *Métodos de análise microbiológica para alimentos. 2ª Revisão*. Brasília, MA, 135 p., 1991/1992.
4. Santos, M. V.; Fonseca, L. F. L. Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções. Pirassununga: 2019, v.1. p.301.
5. Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos*. São Paulo. Livraria Varela. 1997.
6. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. *Microbiologia*. 10º ed, 2012.
7. United States Department of Health, Education and Welfare. *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual for Foods*. 5th ed, 1978.
8. <https://bemconsultoria.com.br/wp-content/uploads/2021/04/Instrucoes-de-Uso-Delvotest.pdf>