

AULA PRÁTICA 2 – MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS EM ALIMENTOS

1 ENUMERAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

1.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de diluente estéril (água peptonada 0,1%)
- ✓ Tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada 0,1%
- ✓ Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Baird-Parker (BP)
- ✓ Tubos com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)
- ✓ Reagentes para testes de coagulase (plasma de coelho)
- ✓ Pipetas / ponteiros estéreis
- ✓ Alças de Drigalski estéreis
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras)
- ✓ Agitador de tubos
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C / contador de colônias

1.2 PROCEDIMENTO

- ✓ Pesar assepticamente 25 g do alimento no saco para homogeneização de amostras;
 - ✓ Adicionar 225 mL de água peptonada 0,1%;
 - ✓ Homogeneizar por ~1 minuto em *Stomacher* (essa é a diluição 10^{-1});
- Obs: para alimentos líquidos, pode-se preparar a diluição 10^{-1} transferindo 1 mL da amostra (ex. leite) para um tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%.
- ✓ A partir da diluição inicial (10^{-1}), realizar diluições subsequentes. Para isso, transferir 1 mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (= 10^{-2}) e assim por diante, até a diluição desejada. Utilizar agitador de tubos para homogeneização;

Semeadura em ágar seletivo diferencial - Baird-Parker

- ✓ Utilizar a técnica de semeadura em superfície, transferindo 0,1 mL de cada diluição selecionada para Placas de Petri contendo o meio Baird-Parker (superfície seca);
- ✓ Com o auxílio de alça de Drigalski, espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção;
- ✓ Incubar as placas (invertidas) em estufa regulada a 35-37 °C por 48 horas.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Obs. Se as contagens estimadas de *S. aureus* na amostra forem menores do que 100 UFC/g ou mL, inocular 1 mL da amostra ou da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3 mL e uma com 0,1 mL.

1.3 RESULTADO

Realizar a leitura selecionando placas que contenham entre 20 e 200 colônias. Contar apenas as colônias típicas de *S. aureus*, que são **circulares, pretas ou cinzas escuras, com 2-3 mm de diâmetro** (em placas cheias são menores, com cerca de 1,5 mm), **lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.**

Diluição	Nº de colônias típicas
10 ⁻¹	
10 ⁻²	
10 ⁻³	

Selecionar 3 a 5 colônias típicas e semear cada colônia em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) para posterior teste de coagulase. Paralelamente, transferir uma alçada de cada tubo de BHI para tubos com Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinados (reserva para testes adicionais, se necessários). Incubar os tubos em estufa regulada a 35-37 °C por 24 horas.

Teste de coagulase: Transferir 0,2 mL de cada cultura obtida em BHI para um tubo estéril e adicionar 0,5 mL de coagulase plasma. Misturar com movimentos de rotação e incubar os tubos a 35-37 °C em banho-maria. Observar, durante seis horas, se há formação de coágulo, considerando os critérios a seguir:

Reação	O que observar	Resultado
Negativa	Não formação de coágulo	Negativo
Reação 1+	Coágulos pequenos e desorganizados	Duvidoso – submeter a testes complementares
Reação nível 2+	Coágulo pequeno e organizado	

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Reação nível 3+	Coágulo grande e organizado	Positivo
Reação nível 4+	Coágulo único, firme e que não se rompe quando o tubo é invertido	

Testes complementares

- Teste de catalase: Cepas de *S. aureus* são catalase positivas.
- Teste de termonuclease: Cepas de *S. aureus* produzem termonuclease.
- Teste de sensibilidade à lisostafina: Células de *S. aureus* geralmente são lisadas pela lisostafina (sensíveis), apresentando resultado positivo nesse teste.
- Teste de utilização anaeróbica da glicose e do manitol: *S. aureus* utiliza a glicose e, usualmente, também o manitol anaerobicamente.
- Coloração de Gram: *S. aureus* são cocos gram-positivos.

Resultado final

Calcular o número de UFC/g ou mL em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

Exemplo

25 colônias características ----- 5 testadas

X ----- 3 confirmadas

X = 15

Então, o número de colônias de estafilococos coagulase positiva (ou *S. aureus*) será igual a 15 multiplicado pelo inverso da diluição.

REFERÊNCIA

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., GOMES, R.A.R., OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017. Capítulo 10 – *Staphylococcus aureus*. Método APHA 39.63:2015 para contagem de *Staphylococcus aureus* em alimentos (com modificações).

2 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP.

2.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW)
- ✓ Tubos de ensaio contendo Caldo Rappaport-Vassilidis (RV)
- ✓ Tubos de ensaio contendo Caldo Tetrionato (TT)
- ✓ Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)
- ✓ Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Entérico Hektoen (HE)
- ✓ Tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) inclinado
- ✓ Tubos contendo Ágar Lisina Ferro (LIA) inclinado
- ✓ Pipetas / ponteiras estéreis
- ✓ Soro *Salmonella* polivalente
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras)
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C

2.2 PROCEDIMENTO

Pré-enriquecimento

Homogeneizar uma porção de 25 g ou 25 mL da amostra em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW). Incubar a 37 °C por 18±2 h.

Enriquecimento seletivo

Agitar cuidadosamente o frasco de pré-enriquecimento (BPW) e transferir 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport-Vassilidis (RV) e 1 mL para 10 mL de caldo Tetrionato (TT). Incubar o caldo RV a 41,5 °C e o caldo TT a 37 °C por 24±3 h.

Obs. O caldo TT deve ser previamente adicionado de solução de iodo (0,2 mL/10 mL) e solução 0,1% de verde brilhante (0,1 mL/10 mL).

Semeadura em ágar seletivo

De cada cultura em RV, estriar uma alçada (estrias de esgotamento) em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e uma alçada em Ágar Entérico Hektoen (HE), de modo a se obter

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

colônias isoladas. Repetir esse procedimento com o caldo TT. Incubar as placas invertidas a 37 °C por 24±3 h.

Seleção das colônias

Após o período de incubação, verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* nos meios de cultura.

No Ágar XLD: colônias de cor rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente ao redor. Cepas de *Salmonella* H₂S fortemente positivas podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. Cepas de *Salmonella* H₂S negativas produzem colônias cor de rosa com centro rosa mais escuro, mas não preto. Cepas de *Salmonella* lactose positivas produzem colônias amarelas com ou sem centro preto. Na ausência de colônias típicas, essas colônias devem ser selecionadas.

No Ágar HE: colônias transparentes, verde-azul, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. Colônias de fermentadores de lactose ou sacarose são de cor salmão-amarelas, com ou sem centro preto. Na ausência de colônias típicas, essas colônias devem ser selecionadas.

Confirmação bioquímica

Para os testes bioquímicos, pode ser utilizado um "kit" miniaturizado de identificação adequado para *Enterobacteriaceae*. Alternativamente, aplicar a série bioquímica descrita abaixo:

- Teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI): Com uma agulha de inoculação, inocular cada cultura em um tubo inclinado de TSI, por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 37 °C por 24±3 h, com as tampas ligeiramente afrouxadas.

Resultado: Observar se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*: rampa alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo) com produção de gás (bolhas ou rachaduras no meio de cultura), com ou sem produção de H₂S (escurecimento ou não do meio no fundo). Reação atípica em TSI que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

- Teste de descarboxilação da lisina (LIA): Com uma agulha de inoculação, inocular cada cultura em um tubo inclinado de Ágar Lisina Ferro (LIA), por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 37 °C por 24±3 h, com as tampas ligeiramente afrouxadas.

Resultado: fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio). Reação atípica em LIA não deve ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas.

Outros testes para confirmação bioquímica: teste de β-galactosidase (-), teste de uréase (-), teste de Voges-Proskauer (-), teste de indol (-) e confirmação sorológica (detecção dos antígenos somáticos e flagelares).

2.3 RESULTADO

Expressar o resultado como “ausência” ou “presença” de *Salmonella* spp. em 25 g ou mL do alimento.

REFERÊNCIA

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., GOMES, R.A.R., OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017. Capítulo 19 – *Salmonella*. Método ISO 6579 para presença/ausência de *Salmonella* em alimentos (com modificações).

3 PESQUISA DE *LISTERIA*

A metodologia tradicional para isolamento de *Listeria* baseia-se no emprego de enriquecimento primário da amostra em meio líquido seletivo, seguido ou não de enriquecimento secundário também em meio seletivo. A seguir, alíquotas do caldo de enriquecimento são semeadas em placas de ágar seletivos e, após o período de incubação, colônias suspeitas são purificadas e identificadas. Obs. Na aula prática a análise será conduzida até identificação do gênero *Listeria*.

De acordo com a metodologia do Food and Drug Administration (FDA), o enriquecimento é feito em duas etapas: o pré-enriquecimento em caldo de enriquecimento de Listeria (BLEB) sem agentes antimicrobianos a 30 °C/4 h (permite recuperar células injuriadas), seguido da etapa de enriquecimento seletivo (quando são adicionados antimicrobianos ao BLEB), com incubação a 30 °C/44 h. Na aula prática, será utilizada a metodologia do FDA com modificações: será utilizado o caldo BLEB já contendo os antimicrobianos desde o início (meio disponível no laboratório) e apenas um meio de cultura sólido seletivo (ao invés de dois, como recomenda o FDA).

3.1 MATERIAL

- ✓ Saco para homogeneização de amostras
- ✓ Frasco com 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB)
- ✓ Placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Oxford (OXA)
- ✓ Placas de Petri contendo Ágar Trypticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) para purificação das colônias
- ✓ Tubos contendo Ágar TSA-YE inclinado
- ✓ Pipetas / ponteiros estéreis
- ✓ *Stomacher* (homogeneizador de amostras)
- ✓ Estufa regulada a 35-37 °C
- ✓ Reagentes para teste de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%), para coloração de Gram e meio para teste de motilidade (Ágar SIM - Sulfeto Indol Motilidade)

3.2 PROCEDIMENTO

Enriquecimento seletivo

Homogeneizar uma porção de 25 g ou 25 mL da amostra em 225 mL de Caldo BLEB. Incubar a 30 °C por 24-48 horas.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição

LAN0330 – Microbiologia dos Alimentos e Epidemiologia das Doenças Veiculadas por Alimentos

Semeadura em ágar seletivo diferencial

Após o período de incubação, agitar cuidadosamente o Caldo BLEB e inocular, por estrias de esgotamento, uma alçada em placa de Petri contendo Ágar OXA. Incubar as placas invertidas a 35 °C por 24-48 horas.

Colônias típicas de *Listeria* no Ágar OXA: colônias negras com centro côncavo, rodeadas por um halo negro de hidrólise da esculina.

Confirmação das colônias típicas

Selecionar pelo menos 5 colônias típicas para confirmação. Para purificação, estriar por esgotamento cada colônia em uma placa com TSA-YE. Incubar as placas a 30 °C por 24-48 horas. Inocular uma colônia típica em TSA-YE inclinado (incubar a 30 °C por 24 h) e, a partir desse tubo, fazer os seguintes testes:

- Teste de motilidade – A partir dos tubos de TSA-YE inclinado, inocular a cultura suspeita em tubos de Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) por “picada” no centro do meio de cultura até uma distância a 1 cm do fundo. Incubar os tubos a 25 °C /5-7 dias. *Listeria* é móvel a 25 °C e desenvolve uma zona de migração típica (semelhante a um “guarda-chuva”). Essa é uma característica típica do gênero *Listeria*.
- Teste de catalase: *Listeria* é catalase positiva.
- Coloração de Gram: *Listeria* é bastonete Gram positivo.
- Teste de verificação de hemólise: No ágar sangue, *L. monocytogenes* apresenta uma zona de hemólise pequena, muitas vezes restrita às bordas da colônia.
- Teste de fermentação: dextrose (+), xilose (-), rhamnose (+), maltose (+) e manitol (-).

3.3 RESULTADO

Expressar o resultado como “ausência” ou “presença” de *Listeria* em 25 g ou mL do alimento.

REFERÊNCIA

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., GOMES, R.A.R., OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª ed. São Paulo: Blucher, 2017. Capítulo 18 – *Listeria monocytogenes*. Método FDA/BAM.10:2016 para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos (com modificações).