

Limitações da Técnica de Isolamento e Enumeração de *Staphylococcus aureus*

Maria da Graça Fichel do Nascimento¹
Anna Cassia Gomes Corbia²
Elmiro Rosendo do Nascimento³

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o principal representante dos *Staphylococcus* coagulase positiva. Ele produz três toxinas, dentre elas as enterotoxinas, importantes por serem muito resistentes a temperaturas elevadas, e reconhecidas como responsáveis por intoxicações alimentares. A intoxicação alimentar causada pelo *S. aureus* se dá logo após a ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada, cuja dose infectante é de 100.000 células/g de alimento (FDA, 1998) e os sintomas são caracterizados por vômito, diarreia, dores abdominais e, eventualmente, dores de cabeça, e prostração (Betley & Harris, 1994).

De acordo com a Legislação vigente para alimentos (ANVISA, 2001), que visa uniformizar os padrões microbiológicos para as práticas comerciais, existe uma tolerância para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva que, para alimentos lácteos varia de 10^2 a 5×10^3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /g, dependendo do alimento (Baird-Parker, 1990). No caso de queijos, depende também do tipo de sua classificação (baixa, média, alta e muito alta umidade). Embora o *S. aureus*

seja a espécie considerada mais patogênica para os animais e o homem (Arbuthnott et al., 1990; Devriese, 1990), a Legislação atual estendeu o limite de tolerância que era feito só para *S. aureus* para *Staphylococcus* coagulase positiva, visto que além do *S. aureus*, existem outras espécies com as mesmas características e propriedades: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. coagulans, *S. hyicus* (Biberstein, 1990).

Como se já não fossem poucas as controvérsias, além das variantes de *Staphylococcus* coagulase positiva, existem também limitações na técnica de enumeração padrão, tomando-se como referência o *S. aureus* (Lancetee & Tanini, 1992). Este trabalho objetiva relatar as limitações de enumeração de *S. aureus* encontradas, tomando-se como padrão a identificação visual das colônias em meio de isolamento, evidenciadas no decorrer dos procedimentos para isolamento e enumeração de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, em queijos Minas frescal e alertar para a importância e necessidade da aplicação dos testes bioquímicos subsequentes, para viabilizar os critérios de diagnóstico.

¹ Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas 29501, CEP 23.020-470, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: graca@ctaa.embrapa.br

² Méd. Vet., M.Sc., Secretaria de Saúde, CEP 28.970-000, Araruama, RJ.

³ Méd. Vet., Ph.D., Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brasil, 64, CEP 24.230-340, Niterói, RJ.

Material e Métodos

A técnica usada para isolamento e enumeração de *S. aureus* de 59 amostras de queijo Minas frescal seguiu as recomendações padrões (APHA, 1992). Uma amostra de 25g de cada queijo, pesada asépticamente, foi homogeneizada por dois minutos, com 225mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} . As diluições subseqüentes foram realizadas após imediata homogeneização dos conteúdos dos tubos em agitador "vortex", com auxílio de pipetador automático e as inoculações, feitas em duplicata, em meios sólidos (Baird-Parker e Vogel Johnson) foram espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski e mesa giratória. As etapas dos procedimentos e técnicas de preparo das amostras, cultivo, enumeração e identificação das colônias suspeitas (Corbia, 2000) foram detalhadamente descritas (Fig. 1).

Resultados e Discussão

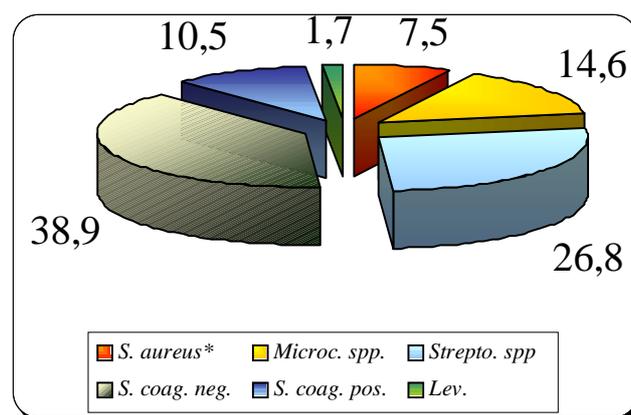
Do total de 59 amostras de queijo Minas frescal examinadas (Corbia, 2000), isolou-se 18 colônias (7,5%) de *S. aureus* coagulase positiva, 25 colônias (10,5%) de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, 93 colônias (38,9%) de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, 35 colônias (14,6%) de *Micrococcus* spp., 64 (26,8%) de *Streptococcus* spp. e quatro colônias (1,7%) de leveduras (Fig. 2). Na maioria das placas com crescimento de colônias típicas (pretas, brilhantes), houve diferenças em relação à presença/ausência de halo, variação de tamanho do próprio halo que, em algumas vezes, parecia que a colônia era circundada por dois halos, além de diferenças em tamanho de colônias. Observou-se que essas diferenças às vezes eram confirmadas, após isolamento das colônias e subseqüentes testes bioquímicos, como presença de diferentes bactérias na mesma amostra. Porém, em alguns casos, foi possível constatar que colônias com e sem a formação de halo, após isolamento e identificação bioquímica, foram consideradas colônias de *S. aureus*. Isto significa que uma contagem de colônias típicas em placas, sem fazer coloração de gram em uma amostragem, com os diferentes tipos de colônias, provavelmente dará um resultado falso para o exame quantitativo de *S. aureus* e/ou *Staphylococcus* spp. coagulase positiva.

Foi possível constatar que o critério de diagnóstico de contagem em placa padronizado, usado pela visualização da presença (formação) de halo ao redor das colônias negras é passível de falhas e, por isso, não deve ser considerado como único indicador de *S. aureus*. Isto se deve à variação fisiológica e/ou genética das cepas de *S. aureus* presentes no alimento tornando a identificação de *S. aureus* ou de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva impossível de ser realizada sem a confirmação por testes bioquímicos (Baird-Parker, 1990; Lancetee & Tanini, 1992). Estes mesmos autores evidenciaram que nem todas as cepas ou variantes têm a capacidade de hidrolisar

a gema do ovo ("lipovitellenin"), formando um halo ao redor da colônia, característica de diagnóstico, comum nos procedimentos rotineiros para identificação e enumeração de *S. aureus*, em meio de Baird-Parker.

Outra observação importante, caracterizada, foi em relação a cor da colônia (preta) nos meios tradicionais, traduzida pela habilidade da bactéria de reduzir o componente seletivo: telurito de potássio (K_2TeO_3), presente tanto em Ágar Baird-Parker quanto em Ágar Voges-Johnson (Lancetee & Tanini, 1992). A presença de colônias pretas não ficou restrita às bactérias (*Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Streptococcus* spp.) isoladas dos queijos analisados. Constatou-se também a presença de algumas leveduras, com características de colônias típicas de *S. aureus*. A diferença foi comprovada pela coloração de Gram, para qual não se encontrou suporte na literatura. Portanto, fica evidente a importância da prática de fazer a coloração de Gram, como teste básico e insubstituível nas provas tradicionais de diagnóstico laboratorial, já que algumas leveduras podem ser confundidas com o *S. aureus*, pelo aspecto visual, coloração e por formação de halo.

De acordo com as observações obtidas, em relação aos microrganismos isolados, existe uma diversificação considerável entre uma mesma espécie, do mesmo gênero. Assim sendo, faz-se necessário dar continuidade a essa caracterização, propondo métodos de avaliação do perfil protéico dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, incluindo *S. aureus*, para identificar as diferenças existentes entre gêneros e entre espécies.



* espécie isolada das amostras 4C, 6A, 9D, 12A, 12D.

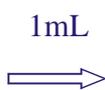
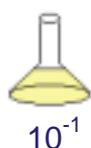
Fig. 2. Distribuição gráfica das percentagens de crescimento bacteriano (UFC/g) de coccus Gram positivos isolado de 58 amostras de queijo Minas frescal disponíveis para consumo em quatro microrregiões no Estado do Rio de Janeiro.

HOMOGENEIZAÇÃO (Dois minutos)



25g de queijo + 225mL de
água peptonada (a. p.)
a 0,1% (dil. 10^{-1})

DILUIÇÕES



10^{-1}



10^{-2}

1mL
→
9mL
a. p.



10^{-3}

1mL
→
9mL
a. p.



10^{-4}

1mL
→
9mL
a. p.



10^{-5}

9mL
a. p.

INOCULAÇÕES
em duplicatas

cada diluição (0,1mL)



BP



BP



VJ



VJ

INCUBAÇÃO

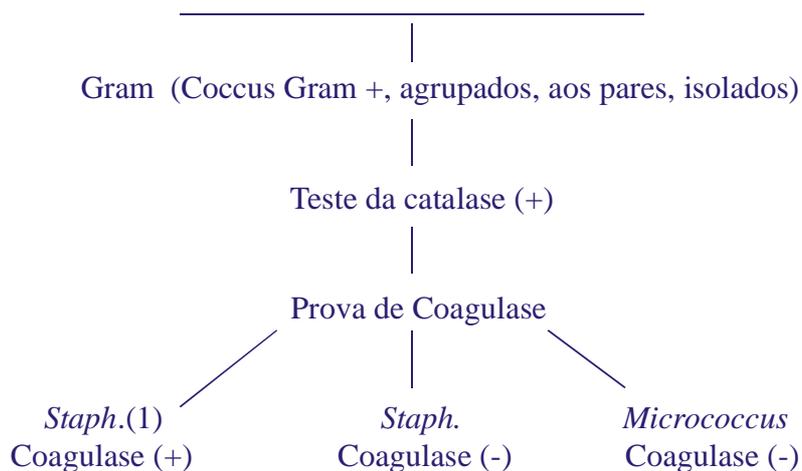
37° (24-48 h)

RESULTADO POSITIVO

BP: colônias negras, pequenas, brilhantes “com halo claro”

VJ: colônias negras com halo dourado (amarelo)

IDENTIFICAÇÃO **Colônias suspeitas (pretas típicas com halo e sem halo)**



(1) Incluir *S. aureus* e *S. intermedius*

Fig. 1. Metodologia utilizada para pesquisa de *Staphylococcus aureus* em Queijos Minas frescal.

Conclusões

Os Staphylococcus coagulase positiva, incluindo S. aureus, podem apresentar crescimento não característico, levando a falhas na quantificação dessas bactérias em meio específico.

É necessário fazer os testes bioquímicos para o diagnóstico dessas bactérias, mesmo para enumeração, devido às limitações de quantificação visual.

A coloração de Gram é absolutamente necessária e deve ser feita sempre, por ser tecnicamente correta e por minimizar os possíveis erros relacionados com a presença e enumeração dos microrganismos pesquisados.

Referências Bibliográficas

- APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C., 1992. 1219 p.
- ARBUTHNOTT, J.P.; COLLEMAN, D.C.; AZAVEDO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. **Journal of Applied Bacteriology. Supplement**, Oxford, p. 101S-107S, 1990.
- BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology. Supplement**, Oxford, p. 1S-8S, 1990.
- BETLEY, M.J.; HARRIS, T.O. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**, London, v.11, p. 9-121, 1994.
- BIBERSTEIN, E.L. Staphylococci. In: Biberstein, E.L.; ZEE, Y.C. **Review of veterinary microbiology**. Boston: Blackwell Scientific Publication, Inc. 1990. cap. 19. p. 150-156.
- ANVISA. Resolução – RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, 2001. Anexo 1, p. 54.
- CORBIA, A.C.G. **Estudo de prevalência sobre alguns patógenos de importância em saúde pública, em queijo tipo Minas frescal**. 2000. 97 f. Tese (Mestrado em

Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

DEVRIESE, L.A. Staphylococci in healthy and diseased animals. **Journal of Applied Bacteriology. Supplement**, Oxford, 71S-80S, 1990.

FDA. **Food microbiological control**. Washington, D.C.: Division of Human Resource Development. Training and Development Branch, 1998. 796 p.

LANCETEE, G.A.; TANINI, S.R. Staphylococcus aureus. In: APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington, D.C., 1992. p. 533-550.

Comunicado Técnico, 45

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 2410-7400
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-7498
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2001): 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Esdras Sundfeld.
Executivo. Membros: Maria Ruth Martins Leão, Neide Botrel Gonçalves, Regina Celi Araújo Lago, Renata Torrezan, Virginia Martins da Matta.

Expediente

Supervisor editorial: Maria Ruth Martins Leão.
Editoração eletrônica: Senai Artes Gráficas.