

COMPARAÇÃO ENTRE OS CALDOS DE ENRIQUECIMENTO "TRYPTIC SOY" COM 10% DE CLORETO DE SÓDIO E GIOLITTI - CANTONI USADOS NA DETERMINAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM ALIMENTOS

Jacqueline Tanury Macruz Peresi*
Mituca Kaku*
Dilma Scala Gelli**
Sonia Isaura de Lima*
Vera Lúcia Silveira Duarte*

RIALA6/800

PERESI, J.T.M. e col. - Comparação entre os caldos de enriquecimento Tryptic Soy com 10% de cloreto de sódio e Giolitti - Cantoni usados na determinação de estafilococos coagulase positiva em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):83-86, 1996.

RESUMO: Foi comparada a eficiência entre dois meios de cultura: Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio (TSBS) e Giolitti - Cantoni Broth (GC) na detecção de *Staphylococcus aureus* em alimentos não processados e processados termicamente; portanto, passíveis de conter células injuriadas pelo calor e/ou pequena quantidade de microrganismos. A técnica utilizada foi a do Número Mais Provável, favorecendo a recuperação do *Staphylococcus aureus*.

O meio GC, além de suas substâncias enriquecedoras, apresenta um sistema inibitório mais acentuado que o TSBS, sendo constituído por cloreto de lítio, telurito de potássio combinado com glicina e condição anaeróbica dada pela adição de vaselina líquida sobre o meio já inoculado. Com essas propriedades o mesmo apresentou maior capacidade de recuperação de *S. aureus*, como também obteve menor número de falsos positivos, quando comparado com o TSBS.

DESCRIPTORIOS: Estafilococos coagulase positiva; Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio; Giolitti-Cantoni Broth; Meios de enriquecimento.

INTRODUÇÃO

Estafilococos coagulase positiva, devido à sua ampla distribuição, tem sido responsável por alta incidência de enfermidades transmitidas por alimentos³. Ainda é parâmetro microbiológico constante na legislação em vigor.

O referido microrganismo pode estar presente em grande número em alimentos, sendo isolado em meios de cultura convencionais contendo agentes seletivos, inibindo, assim, grande parte da microbiota existente no alimento⁸. Embora os meios seletivos sejam aceitos para enumeração de células não debilitadas,

eles freqüentemente inibem o crescimento de células injuriadas^{4,8}. A detecção dessas células, no entanto, é importante, pois quando em condições favoráveis de crescimento produzem enterotoxina e, portanto, podem ser causa potencial de doenças de origem alimentar⁹. A enumeração e isolamento desses microrganismos dependem de meios de recuperação⁵.

A metodologia recomendada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC)² preconiza a utilização do meio de cultura Tryptic Soy Broth acrescido de 10% de cloreto de sódio (TSBS) para a detecção de *S. aureus*. Trata-se de um meio de enriquecimento recomendado principalmente para análise de alimentos onde se espera encontrar células injuriadas ou baixa concentração destes microrganismos⁴. O cloreto de sódio

* Do Instituto Adolfo Lutz - Lab.I de São José do Rio Preto-SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz - Lab. Central - São Paulo - SP.

na citada concentração exerce a função de inibir a microbiota presente, facilitando o desenvolvimento do *S. aureus*⁵. Porém tem sido demonstrado que esse meio inibe células injuriadas e não injuriadas de *S. aureus*⁴.

O meio de cultura Giolitti - Cantoni Broth (GC) é proposto e foi comparado com TSBS. Além de substâncias enriquecedoras para *S. aureus* como a manita, piruvato de sódio e glicina, o meio possui cloreto de lítio que inibe bacilos gram negativos fermentadores da lactose e telurito de potássio combinado com glicina, inibindo bacilos gram positivos. A vaselina líquida adicionada nos tubos após a sementeira cria condições para a inibição de microrganismos³.

MATERIAIS E MÉTODOS

A - Meios de cultura:

1) Tryptic Soy Broth (Difco 0370-17) preparado de acordo com as especificações do fabricante ao qual foi adicionado cloreto de sódio na concentração de 10%, antes da autoclavação do meio. Distribuí-se o meio em tubos de 16 x 160mm e 18 x 180 mm em concentração simples e dupla respectivamente, num volume de 8 e 13ml.

2) Giolitti Cantoni Broth Base (Difco 1809-17-2), preparado de acordo com as especificações do fabricante, ao qual foi adicionado 15,8 ml/l de telurito de potássio na concentração de 3,5% após a autoclavação do meio e no momento do uso. O referido meio de cultura foi distribuído em concentração simples em tubos de ensaio de 16 x 160mm e 18 x 180 mm num volume de 9 e 18 ml respectivamente.

B - Amostras

Foram analisadas 213 amostras de alimentos, sendo 167 de leite pasteurizado, 10 de condimentos e temperos, 14 de produtos de confeitaria, 7 de pratos prontos para o consumo, 4 de carnes e derivados, 4 de gelados comestíveis, 2 de derivados de leite e 5 de amostras diversas, coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias dos ERSAS de abrangência do Lab. I de São José do Rio Preto, Delegacias de Polícias e pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

Alimentos sólidos:

Após homogeneização de 25g em 225 ml de água peptonada 0,1%, alíquotas de 10, 1,0 e 0,1 ml foram transferidas respectivamente para a 1^a, 2^a e 3^a séries de tubos de TSBS, correspondendo assim a 1,0g; 0,1g e 0,01g do alimento sob análise. A técnica foi a de tubos múltiplos, série de 3, Número Mais Provável - NMP⁷.

Amostras líquidas foram semeadas diretamente: alíquotas de 1 ml foram transferidas para a 1^a série

de 3 tubos; a 2^a e 3^a séries receberam, respectivamente, 1,0 ml das diluições 10⁻¹, 10⁻² correspondendo, assim, a 0,1 ml e 0,01 ml do alimento analisado.

Foram considerados suspeitos para estafilococos coagulase positiva, os tubos de TSBS que apresentaram turvação após 24-48h de incubação a 35°C. Material dos mesmos foi plaqueado em agar chocolate para o isolamento deste microrganismo, caso presente. Colônias suspeitas foram semeadas em agar Baird-Parker para verificação de comportamento da bactéria no referido meio de cultura. Após esta avaliação, a colônia foi repicada em agar nutriente para posterior prova de coagulase em lâmina e em tubo. Considerou-se tubo positivo aquele que apresentou cepas coagulase positiva em lâmina e em tubo (4+). O resultado foi expresso em NMP.

Os materiais semeados em caldo GC foram tratados conforme descrito para o TSBS, observando, porém, que os tubos considerados suspeitos foram os que apresentaram enegrecimento do meio após 24-48h de incubação a 35°C, sendo posteriormente semeados em agar Baird-Parker.

RESULTADOS

Os resultados de amostras suspeitas, ou seja, com turvação no caldo TSBS e enegrecimento em GC e confirmadas, com isolamento a partir do agar Baird-Parker de colônias coagulase positivas, estão expressos na Tabela 1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os dados expressos na Tabela 1 indicam que a presença de estafilococos coagulase positiva é significativa em produtos de confeitaria, leite fluído e pratos prontos para o consumo, independente do meio de enriquecimento utilizado. Entretanto, os dados indicam que a positividade é proporcionalmente maior no GC. Os resultados obtidos pelo GC indicaram a presença desta bactéria em gelados comestíveis (sorvetes), enquanto que no TSBS não houve positividade. Esta observação permite concluir que o sistema inibitório presente no GC não interfere na recuperação de células injuriadas fisiologicamente.

A análise da Tabela 1 também revela que o número de tubos suspeitos em TSBS apresentam uma positividade para estafilococos coagulase positiva proporcionalmente menor que a encontrada com o caldo GC.

Pela Tabela 2, observa-se diferenças quanto ao NMP. Os níveis encontrados pelo uso do GC são maiores do que os respectivos, encontrados no TSBS.

TABELA 1

Amostras suspeitas e confirmadas para estafilococos coagulase positiva em TSBS¹ e GC².

AMOSTRAS	Nº DE AMOSTRAS	TSBS ¹				GC ²			
		COM TURVAÇÃO ³		CONFIRMAÇÃO ⁴		ENEGRECIMENTO ³		CONFIRMAÇÃO ⁴	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Leite	167	165	98,8	7	4,2	84	50,3	23	13,8
Condimentos e temperos	10	5	50,0	0	0	1	10,0	0	0
Produtos de confeitaria	14	14	100,0	8	57,1	12	85,7	10	71,4
Pratos prontos para o consumo	7	6	85,7	1	14,3	6	85,7	2	28,6
Carnes e derivados	4	2	50,0	0	0	1	25,0	0	0
Gelados comestíveis	4	4	100,0	0	0	3	75,0	1	25,0
Derivados do leite	2	2	100,0	0	0	2	100,0	0	0
Outros	5	3	60,0	0	0	0	0	0	0
Total	213	201	94,3	16	7,5	109	51,2	36	16,9

¹ - Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio

² - Giolitti-Cantoni Broth

³ - Leitura direta após incubação do Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio e tubos de Giolitti-Cantoni com enegrecimento (suspeitos)

⁴ - Colônias coagulase positivas isoladas do agar Baird-Parker

Os níveis de estafilococos coagulase positiva, obtidos por NMP, estão expressos na Tabela 2.*

TABELA 2*

NMP mínimo e máximo de estafilococos coagulase positiva em TSBS¹ e GC²

AMOSTRAS	TSBS ¹		GC ²	
	MÍNIMO	MÁXIMO	MÍNIMO	MÁXIMO
Leite	0,3	2,1	0,3	9,3
Condimentos e temperos	0	0	0	0
Produtos de confeitaria	1,2	110	0,91	>240
Pratos prontos para o consumo	3,6	3,6	0,91	24,0
Carnes e derivados	0	0	0	0
Gelados comestíveis	0	0	0	0,36
Derivados de leite	0	0	0	0
Outros	0	0	0	0

¹ - Tryptic Soy Broth com 10% de cloreto de sódio

² - Giolitti - Cantoni Broth

Durante a realização deste trabalho, observou-se que o número de suspeitos é maior quando do uso do TSBS (Tabela 1) e que o NMP confirmado é relativamente diferente, mais baixo, quando comparado com o caldo GC, cujo NMP dos suspeitos é mais próximo dos confirmados, indicando maior especificidade do meio.

Pelo exposto, conclui-se que o uso do caldo GC permite melhor recuperação e quantificação de estafilococos coagulase positiva em alimentos. Este meio, por estas características, pode ser considerado mais adequado, apresentando ainda menor incidência de tubos falsos positivos, quando comparado com o TSBS.

Novas metodologias como da APHA⁶ indica o uso do meio Tryptic Soy Broth adicionado de 10% de cloreto de sódio e de 1% de piruvato de sódio. Portanto, considerando o presente levantamento, sugere-se a complementação dos dados deste trabalho comparando o meio GC com o meio citado acima (APHA).

Sugere-se ainda que a avaliação dos métodos de recuperação seja considerada, quando do estabelecimento de normas e padrões de qualidade de produtos alimentícios.

RIALA6/800

PERESI, J.T.M. e col. - Comparison of Tryptic Soy Broth with 10% salt and Giolitti-Cantoni Broth used in determination of coagulase positive staphylococci in foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):83-86, 1996.

ABSTRACT: The efficiency among two media was compared: Tryptic Soy Broth with 10% salt (TSBS) and Giolitti Cantoni Broth (GC) to detect and enumerate *Staphylococcus aureus* in non processed and thermally processed food supposed to contain injured cells by high temperature treatment and/or to contain small numbers of this microorganisms. The technique used was the Most Probable Number (MPN), supporting the recovering of *Staphylococcus aureus*.

The GC broth medium, with its enrichment substances and lithium chloride, potassium tellurite with glycine used under anaerobic condition due to the addition of liquid vaseline immediately before inoculation shows stronger inhibitory effect to the non *S. aureus* microorganisms, when compared with TSBS. Despite this, the medium showed a better capacity on recovering *S. aureus*, showed also a smaller number of false positives when compared to the TSBS.

KEY-WORDS: Coagulase-positive staphylococci; Tryptic Soy Broth with 10% salt; Giolitti-Cantoni Broth; enrichment medium.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAER, E.F.; GRAY, R.J.H.; ORTH, D.S. - "Methods for the Isolation and Enumeration of *Staphylococcus Aureus*". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Speck, M.L., ed. 1^a ed., C. 31, p. 374-386, 1976.
2. Bennett, R.W. - revisão 1980. - "*Staphylococcus aureus*". In: *Bacteriological Analytical Manual* - AOAC, ed. 5 th ed. revisada, c.XI, p. XI-6 e XI-7, 1978.
3. GIOLITTI, G. & C. CANTONI, - A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. *J. Appl. Bacteriol.*, **29**:395-398, 1966.
4. GRAY, R.J.H.; M.A. GASKE, & Z.J., ORDAL. - Enumeration of thermally stressed *Staphylococcus aureus* MF 31. *J. Food Sci.*, **39**: 844-846, 1974.
5. LANCETTE, G.A. - Current Resuscitation Methods for Recovery of Stressed *Staphylococcus aureus* Cells from Foods. *J. Food Prot.*, **49**:477-481, 1986.
6. LANCETTI, G.A.; TATINI, S.R., - "*Staphylococcus aureus*". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Vanderzant, C. e Splitstoesser, D.F., ed. 3 rd, c.33, p. 541-542.
7. PEELER, J.T.; HOUGHTBY, G.A.; RAINOSEK, A.P. - "The Most Probable Number Technique". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, Vanderzant, C. e Splitstoesser, D.F., ed. 3 rd, c. 6, p. 105-120, 1992.
8. RAY, B. - Methods to detect stressed microorganisms. *J. Food Prot.* **42**:346-355, 1976.
9. SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L. & PALUMBO, S.A. - Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Prot.*, **46**:545-555, 1983.