

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
Área: Inspeção de Produtos de Origem Animal

Aluno: Thairan Eduardo Lopes Vieira
Supervisor: Profº Dr. Luciano dos Santos Bersot
Orientador: Profº Dr. Luciano dos Santos Bersot

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte das
exigências para conclusão do Curso
de Graduação em Medicina
Veterinária da Universidade Federal
do Paraná

PALOTINA-PR
DEZEMBRO DE 2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná

Setor Palotina

Curso de Medicina Veterinária


Relatório Final de Estágio Supervisionado

Área de Estágio: Inspeção de Produtos de Origem Animal

Acadêmico: Thairan Eduardo Lopes Vieira

Orientador de Estágio: Profº Dr. Luciano dos Santos Bersot

O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI APRESENTADO E
APROVADO PELA SEGUINTE
BANCA EXAMINADORA:



Profº Vinicius Cunha Barcellos



M.V. Residente Thiago Henrique Bellé



Supervisor: Profº Dr. Luciano dos Santos Bersot

Palotina, 5 de Dezembro de 2016.

“Você nunca está errado em fazer a coisa certa.”

Mark Twain

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio, meio e fim.

Aos meus pais, Edmundo e Marlise, pelo amor e carinho.

A minha esposa Daiana, pelo amor, paciência, e companheirismo durante a jornada acadêmica.

A Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso.

A toda a equipe LACOMA, professores, técnicos, acadêmicos e principalmente aos residentes, Thiago e Kadigia, que muito me auxiliaram no decorrer do estágio.

As mestrandas Mallu e Ana Paula, pelo conhecimento transmitido durante a graduação.

Aos professores, em especial ao Prof^o Dr. Luciano dos Santos Bersot, meu orientador, pela inestimável ajuda.

RESUMO

O presente relatório de estágio supervisionado obrigatório tem por finalidade relatar as atividades desenvolvidas no período de 01/08/2016 a 17/11/2016, no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água - LACOMA, situado na Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. O estágio foi supervisionado e orientado pelo Prof^o. Dr. Luciano dos Santos Bersot e incluiu atividades relativas a inspeção de produtos de origem animal e ao controle microbiológico de alimentos. Foram desenvolvidas as seguintes atividades: análise de leite (teste de alizarol e álcool, crioscopia, determinação da acidez do leite, análise de microrganismos mesófilos, análise de microrganismos psicrotrofos proteolíticos, análise de bactérias ácido lácticas) , análise de potabilidade de água , análise de *Salmonella* sp. (pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento, exame bioquímico preliminar, exame bioquímico complementar) , extração de DNA de *Salmonella* sp. para a futura realização de biologia molecular .

Palavras-chave: Análise; Microrganismos; Inspeção.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Teste de Alizarol e Álcool positivos e negativos	24
FIGURA 2. Ágar Leite apresentando colônias características de microrganismos proteolíticos.....	26
FIGURA 3. Ágar MRS apresentando halos de inibição do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
FIGURA 4. Caldo MRS	28
FIGURA 5. Microtubos pré armazenamento	29
FIGURA 6 Crioscópio Eletrônico.	30
FIGURA 7 Nuclei Lysis Solution.	32
FIGURA 8. Solução de RNase	32
FIGURA 9. Protein Precipitation Solution	33
FIGURA 10. DNA Rehydration solution	34
FIGURA 11 Caldo RVS.	36
FIGURA 12. Caldo TT	36
FIGURA 13. Ágar XLD	37
FIGURA 14. Ágar BS	38
FIGURA 15. LIA com presença de lisina descarboxilase e sulfeto de hidrogênio.....	40
FIGURA 16. TSI com consumo de glicose, presença de sulfeto de hidrogênio e gás	41
FIGURA 17. Caldo Malonato positivo	43
FIGURA 18. Caldo Uréia, urease negativo e positivo	44
FIGURA 19. Ágar Citrato de Simmons positivo	45
FIGURA 20. Teste VM positivo.....	46
FIGURA 21. Teste VP positivo	46
FIGURA 22. Meio SIM, Indol e sulfeto positivos, motilidade negativa	47
FIGURA 23. Caldo VBBL e Caldo EC	49
FIGURA 24. Ágar EMB apresentando colônias características de <i>E.coli</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação Bioquímica Presuntiva de <i>Salmonella</i>	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	Água Peptonada Tamponada
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
BS	Ágar Bismuto Sulfito
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Entero-hemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
HUS	Síndrome Urêmica Hemolítica
LIA	Ágar Lisina Descarboxilase
LST	Caldo Lauril Sulfato Triptose
LT	Termolábil
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ml	Mililitro
MRS	Ágar Lactobacillus segundo Man, Rogosa e Sharpe
MRVP	Caldo Teste de Vermelho de Metila e de Voges- Proskauer
NMP	Número Mais Provável
PCA	Ágar Padrão para Contagem
RNA	Ácido ribonucléico
RVS	Caldo Rappaport- Vassiliadis Soja
SIM	Meio de motilidade, Indol e sulfeto
ST	Termoestável
TT	Caldo Tetratonato

TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
VBBL	Caldo Verde Brilhante Bile Lactose
XLD	Ágar Xilose lisina Desoxicolato
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2.LOCAL DE ESTÁGIO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Microrganismos Mesófilos	17
3.2 Microorganismos Psicrotróficos	17
3.3 Coliformes.....	18
3.4 <i>Escherichia coli</i>	18
3.5 <i>Salmonella</i> spp	20
4. ATIVIDADES REALIZADAS.....	22
4.1 Análise de leite	22
4.1.1 Teste de alizarol e álcool	23
4.1.2 Análise de microrganismos mesófilos	24
4.1.3 Análise de microrganismos psicrotróficos e proteolíticos.....	25
4.1.4 Análise de bactérias ácido lácticas	26
4.1.5.Crioscopia.....	29
4.1.6 Determinação de acidez em leite	30
4.2 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	31
4.3 Análise de <i>Salmonella</i> spp em ovos.....	34
4.3.1 Pré-enriquecimento.....	34
4.3.2 Enriquecimento seletivo	35
4.3.3 Plaqueamento seletivo diferencial.....	37
4.3.4 confirmação bioquímica	38
4.3.4.1 Exame bioquímico preliminar	39
4.3.4.2 Exame bioquímico complementar	42
4.3.4.2.1 Caldo Malonato	42
4.3.4.2.2 Caldo Uréia	43
4.3.4.2.3 Ágar Citrato de Sinmons	44
4.3.4.2.4 Caldo MRVP.....	45

4.3.4.2.5 Meio de Motilidade, Indol e Sulfeto	47
4.4 Análise de potabilidade de água.....	48
4.4.1 Coliformes.....	48
4.4.1.1 Teste confirmatório de <i>E.coli</i>	50
4.4.1.2 Resultados.....	50
4.4.2 Análise de mesófilos	51
5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) podem ser conceituadas como doenças que acometem o homem por meio da ingestão de agentes presentes em água e alimentos. Esses agentes podem ter origem microbiológica, como bactérias, vírus e protozoários; origem parasitária, pela ingestão de parasitas capazes de colonizar o organismo humano e origem química, através da ingestão de metais pesados, antibióticos, pesticidas, dentre outras substâncias (ROSA,2008).

Cabe salientar que doença transmitida por alimento é um termo genérico, que denomina uma síndrome caracterizada pelo aparecimento de sintomas como anorexia, náuseas, vômitos, e/ou diarreia, que pode ser ou não acompanhada de febre, atribuídos a ingestão de alimentos e água contaminados. A doença não acomete exclusivamente o sistema gastrointestinal, podendo ocorrer infecções extra intestinais, em diferentes órgãos e sistemas, como rim, fígado, meninges, sistema nervoso central, dentre outros, de acordo com o agente envolvido (BRASIL, 2004).

A epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos é subestimada, uma vez que, muitos dos acometidos não procuram por atendimento médico, e por isso não ocorre a identificação do agente com posterior notificação aos órgãos competentes.

A necessidade de suprir a demanda nutricional da população fez com que fosse intensificada a produção de alimentos. Essa intensificação foi acompanhada de um grande avanço tecnológico, o que ocasionou uma expansão da indústria alimentícia. Em meio a essa expansão, surgiu a necessidade de controlar a qualidade e a inocuidade dos alimentos.

Neste cenário, os laboratórios constituem uma importante ferramenta para a detecção de possíveis contaminantes, evitando que os consumidores adquiram alimentos impróprios para o consumo.

As análises microbiológicas tornam-se indispensáveis, na medida que podem revelar as condições de higiene que um alimento foi submetido durante o preparo.

Este relatório de estágio curricular supervisionado tem por fim expor as atividades desenvolvidas na Universidade Federal do Paraná – UFPR, Setor Palotina,

especificamente no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA.

Relatar-se-ão neste trabalho, análises referentes ao controle microbiológico de leite, ovos e água.

2. LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado obrigatório foi desempenhado na Universidade Federal do Paraná, no Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água-LACOMA, situado na cidade de Palotina, no estado do Paraná. As atividades tiveram duração de 600 horas, e foram desenvolvidas no período de 01/08/2016 a 17/11/2016.

O LACOMA desenvolve suas atividades desde o ano 2000, sob a supervisão do Professor Dr. Luciano dos Santos Bersot, visando o aprimoramento científico dos acadêmicos nas áreas de inspeção de produtos de origem animal e controle microbiológico de alimentos.

O laboratório é organizado em seções, de modo a facilitar a dinâmica laboratorial:

- **Recepção:** seção onde as amostras eram recebidas e cadastradas, sendo realizados neste ambiente os procedimentos administrativos do laboratório.
- **Sala de armazenamento de amostras:** é uma sala situada em anexo a recepção, que tem por finalidade o armazenamento de meios já preparados que necessitam de refrigeração. Esta seção ainda possui outras utilidades como o armazenamento de amostras para contraprova, assepsia das mãos, permanência de máscaras, luvas e álcool para a utilização antes de adentrar a sala de pesagem.
- **Sala de pesagem:** é a sala onde de fato iniciam-se as análises. Neste local são realizadas as pesagens e diluições das amostras, e todas as etapas prévias a primeira incubação, como por exemplo, o plaqueamento. O local possui uma capela de fluxo laminar e demais equipamentos.
- **Sala de incubação:** local continha cinco incubadoras para demanda bioquímica de oxigênio (BOD), um freezer, uma geladeira e duas estufas. Neste ambiente são realizadas as incubações de amostras, e também o armazenamento de cepas.
- **Sala de repique:** é composta por bancadas dotadas de bicos de Bunsen, fluxo de patógenos, dois banhos-maria, uma pia e uma estufa de uso exclusivo para a microbiologia clínica. Apresenta também um microscópio e dois contadores para placas, além é de um local apropriado para armazenamento de materiais.

Neste ambiente é realizado o processamento de amostras que já foram submetidas a incubação, tanto da área de inspeção e controle microbiológico de alimentos, quanto de materiais provenientes da microbiologia clínica.

- Área suja: é composta de duas geladeiras, sendo uma para armazenamento de material contaminado não autoclavado, e a outra para o armazenamento do material autoclavado, sendo tais materiais acondicionados em sacos plásticos adequados. Apresenta ainda, uma autoclave, uma bancada com duas pias e uma estufa para a lavagem e secagem das vidrarias. A sala é provida também de um espaço para o armazenamento de materiais como baldes e frascos para descarte. O ambiente tem por finalidade o armazenamento e autoclavagem do material contaminado destinado ao descarte, como placas de Petri e meios de cultura, e também a lavagem e secagem de utensílios reutilizáveis.
- Sala de preparo: este ambiente é composto por uma capela, uma bancada com pia, um destilador de água, um micro-ondas e ainda por uma área destinada ao armazenamento de materiais. Nesta seção são preparados os meios de cultura e ainda são desempenhadas outras atividades não contaminadas como o preparo de materiais para a autoclavagem e o armazenamento de objetos reutilizáveis.
- Sala de preparo anexo: é composta por uma mesa, dois armários, uma geladeira e um suporte para armazenamento de meios que não necessitam de refrigeração. Nesta sala são armazenadas a maior parte das vidrarias, os meios de cultura desidratados, suplementos e reagentes que necessitam de refrigeração. Permanecem nesse ambiente meios de cultura já preparados que não necessitam de refrigeração, tais como: Caldo *Escherichia coli* (EC), Caldo verde brilhante bile lactose (VBBL) e solução salina.
- Sala de autoclaves limpas: contém três autoclaves, sendo uma automática e duas não automáticas, uma mesa e uma estante móvel para transporte de materiais. Esta sala é utilizada para a autoclavagem de meios de cultura e materiais não contaminados como alças, pipetas, recipientes de coleta, provetas, entre outros.
- Sala de testes físico-químicos: composta por uma bancada com pia, um armário para o armazenamento de reagentes, um aparelho de crioscopia, além de uma estrutura para o armazenamento de utensílios específicos dos testes

físico-químicos. É um espaço destinado para a realização de provas físico-químicas, como crioscopia e acidez, coloração de Gram e para armazenamento de diferentes reagentes.

- Sala de biologia molecular: sem uso definido até o momento.
- O ambiente oferece ainda banheiros, despensa e uma copa, para uma melhor acomodação dos servidores e estudantes, além de salas de estudo, salas de aula e salas dos professores.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microrganismos Mesófilos

Os microrganismos denominados mesófilos são aqueles que, apresentam capacidade de multiplicação no intervalo de temperatura de 20°C a 45°C, conseguindo portanto, multiplicar-se a temperatura ambiente.

Essa classe de microrganismos indica a qualidade de obtenção e de processamento dos alimentos, sendo sua presença em altas contagens indicativa de procedimentos higiênicos inadequados no processamento, beneficiamento e conservação de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

3.2 Microrganismos Psicrotróficos

Microrganismos psicrotróficos são aqueles que conseguem se multiplicar quando submetidos a temperaturas de refrigeração.

Neste sentido, de acordo com GERMANO & GERMANO (2001), os psicrotróficos são um grupo de microrganismo capaz de desenvolver-se em uma faixa de temperatura de 0°C a 7° C.

Inclusas nesse grupo, cabe destaque a bactéria *Listeria monocytogenes*, que é uma bactéria psicrotrófica mundialmente conhecida por desenvolver-se em ambientes refrigerados.

Como são microrganismos capazes de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, muitos dos alimentos associados a infecção, são aqueles que necessitam ser acondicionados nestas condições, como o leite e seus derivados, produtos cárneos de múltiplas espécies e produtos de origem vegetal.

3.3 Coliformes

A detecção de coliformes em alimentos e água constitui a principal ferramenta para a avaliação de inocuidade. A contaminação pode ocorrer por condições higiênicas precárias por parte dos manipuladores, degradação dos alimentos e deficiências higiênicas no processo de transporte e estocagem.

Os coliformes totais constituem um grupo de bactérias indicadoras de contaminação, sendo classificadas como tal as bactérias bacilares Gram negativas, não esporogênicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, oxidase negativas, que conseguem fermentar a lactose em um período de até 48 horas, quando submetidas a incubação a 37°C (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

Neste grupo estão contidos uma variedade de microrganismos pertencentes a família Enterobacteriaceae, incluindo os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (CARVALHO, 2010).

Já os coliformes termotolerantes podem ser definidos como um subgrupo pertencente aos coliformes que possuem a habilidade de fermentar a lactose a 44-45°C durante um intervalo de 24 horas (PELCZAR et al., 2009). Este grupo é mais representativo no que tange a possibilidade de contaminação fecal, quando comparados aos coliformes totais, não apresentando no entanto, resultados tão precisos quanto a identificação de *Escherichia coli*.

3.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria comumente encontrada no trato intestinal de humanos e animais, podendo ser patogênica tanto dentro como fora do trato gastrointestinal (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008). É uma espécie bacteriana que tem sido isolada com muita frequência em laboratórios clínicos, sendo responsável por doenças infecciosas que acometem os mais diversos sistemas orgânicos dos seres humanos (KONEMAN et al., 2008).

São bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, móveis ou imóveis, oxidase negativos, capazes de fermentar a glicose. A lactose é fermentada pela

maioria das cepas, o que as distingue de outros microrganismos intestinais como *Salmonella* e *Shigella* (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

Apresentam antígenos estruturais, denominados: O (somático), H (flagelar) e K (capsular), que norteiam a sorotipagem da classe (KONEMAN et al., 2008).

Os seres humanos e os animais se infectam geralmente pela via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados, podendo desenvolver síndromes intestinais distintas, de acordo com a patogenicidade da cepa ingerida.

Certas cepas de *E. coli* podem causar enterite ou gastroenterite por meio de seis mecanismos distintos, resultando em seis síndromes clínicas diferentes. São elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KONEMAN et al., p. 232, 2008).

ETEC, conhecida por causar a diarreia dos viajantes, ao ser ingerida coloniza o intestino delgado, e através da produção de duas enterotoxinas, uma termolábil (LT) e outra termoestável (ST), inibe a reabsorção de sódio (ST) e promove uma hipersecreção prolongada de íons cloreto e água (LT) pelas células da mucosa intestinal. Como resultado, o intestino fica repleto de fluido, ocasionando diarreia líquida que pode durar vários dias (HARVEY; CHAMPE; FISH, 2008).

Em humanos, EPEC é responsável por causar diarreia em crianças, sobretudo em regiões que apresentam condições sanitárias precárias. Ao adentrar o sistema gastrointestinal, EPEC ataca as células da mucosa do intestino, provocando a destruição das microvilosidades, o que compromete a capacidade de reabsorção do intestino e ocasiona a diarreia (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

EIEC é responsável por ocasionar uma síndrome composta por dores abdominais, febre, mal estar e disenteria acompanhada de sangue e muco. O microrganismo invade as células do intestino grosso e provoca necrose (PELCZAR et al., 2009).

Já a síndrome causada por EHEC, é originada por meio da adesão desta a células do intestino grosso, com posterior produção de toxinas Shiga, toxinas estas que causam uma grave forma de colite hemorrágica. Em alguns pacientes acometidos, principalmente crianças, a doença progride para Síndrome Urêmica

Hemolítica (HUS), que é caracterizada por febre, insuficiência renal aguda, anemia hemolítica e trombocitopenia (KONEMAN et al., 2008).

EAEC e DAEC foram descritas recentemente, de maneira que seus mecanismos de patogenicidade são pouco esclarecidos.

3.5 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertencente à família Enterobacteriaceae, constitui um grupo de bactérias Gram negativas, em forma de bacilo, anaeróbicos facultativos, não esporogênicos, que apresentam flagelos peritríquios, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, uma vez que estas são imóveis (CARVALHO, 2010).

Produzem gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*), e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono (GERMANO; GERMANO, 2001).

São produtoras de sulfeto de hidrogênio, capazes de reduzir nitrato a nitrito, Indol e urease negativas (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

São microrganismos com certa resistência ao calor e as substâncias químicas, conseguindo multiplicar-se no intervalo de temperatura de 5°C – 45°C, no entanto, a temperatura ideal de multiplicação é de 37° C. Em relação ao potencial hidrogeniônico (pH), multiplicam-se entre pH 4-9, apresentando o pH 7 como potencial ideal (PELCZAR et al., 2009).

De acordo com Trabulsi (2005) o sistema Kauffmann-White é o mais utilizado para a classificação taxonômica do gênero, dividindo-o em sorotipos de acordo com a composição antigênica, segundo os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi).

As síndromes causadas pelo gênero costumam ser divididas em três grupos: febre tifoide, causada por *S. Typhi*, febres entéricas, causadas por *S. Paratyphi* A, B, C, e as enterocolites, também denominadas salmoneloses, causadas pelos demais sorotipos não hospedeiros-específicos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Habitam tanto o trato intestinal do homem, quanto dos animais, como pássaros, répteis e animais de granja, o que contribui para a disseminação do agente, uma vez que é eliminado nas fezes daqueles que se contaminam.

A infecção humana pelo gênero ocorre principalmente pelo consumo de água e alimentos contaminados. Os alimentos usualmente envolvidos são cremes doces utilizados em tortas, carne moída, linguiças, carne de aves e ovos (PELCZAR et al.,2009).

4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

4.1 Análise de leite

Esta atividade foi realizada acompanhando-se o projeto de iniciação científica da acadêmica Jhennifer Arruda Schmiedt.

O projeto consistia na avaliação da qualidade do leite após ordenha na propriedade, visando avaliar o comportamento da microbiota presente, além de estimar o efeito do armazenamento sob refrigeração.

O objetivo principal da análise era simular o transporte do leite sem refrigeração até o laticínio, fato que é permitido pela legislação desde que o tempo de transporte não exceda duas horas (BRASIL, 2011).

Foram realizadas durante o experimento dez coletas de leite, sempre após a ordenha da tarde, evitando portanto, que houvesse mistura do leite a ser pesquisado com produtos de ordenhas anteriores.

As amostras foram analisadas em seis tempos diferentes, sendo denominados:

-T₀: amostras que recém chegaram ao laboratório;

-T₁: amostra incubada por 2 horas a 25°C;

-T₂: amostra incubada por 2 horas a 36°C;

-T₃: amostra armazenada por 24 horas a 7°C;

-T₄: amostra armazenada por 48 horas a 7°C;

-T₅: amostra armazenada por 60 horas a 7°C.

Os tempos 1 e 2 apresentavam por finalidade simular o transporte de leite até o laticínio em duas temperaturas ambientes distintas.

Já os demais tempos servem para avaliar a qualidade do leite cru refrigerado ao longo do tempo.

Todas as amostras, em todos seus respectivos tempos, foram testadas para microrganismos mesófilos, psicrotróficos proteolíticos e bactérias ácido lácticas, além de serem submetidas as provas de alizarol, álcool, acidez e crioscopia.

Apesar da maioria das análises terem sido feitas simultaneamente, serão expostas no trabalho em separado, para uma melhor compreensão.

4.1.1 *Teste de alizarol e álcool*

No teste de alizarol e álcool (Figura 1) as amostras foram submetidas a 5 concentrações diferentes de alizarol e álcool, sendo cada amostra colocada em uma placa de Petri e testada nas concentrações de 72%, 76%, 78%, 82% e 86%. Os dois testes eram realizados em separado, sendo destinada uma placa para cada concentração de alizarol, e outra placa para cada concentração de álcool.

Com o auxílio de uma pipeta de vidro, eram dispensados 2 ml de leite em cada placa, e logo após, eram adicionados os respectivos reagentes no mesmo volume. As placas eram homogeneizadas manualmente e observava-se a formação de grumos para o alizarol e álcool, e alteração de coloração para o alizarol.

As amostras nas quais houvesse formação de grumos eram consideradas positivas para o teste de alizarol ou álcool, conforme o caso. As amostras submetidas ao teste de alizarol eram também classificadas em relação ao pH, sendo consideradas ácidas aquelas que apresentassem coloração amarelada, alcalinas as que exibissem coloração roxa e normais as que originassem coloração vermelho tijolo.

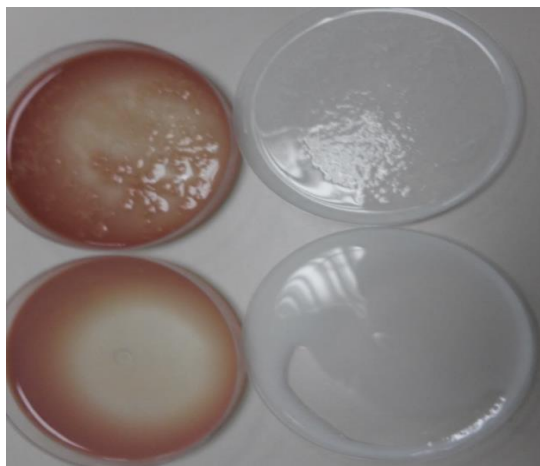


Figura 1: Teste de Alizarol (esquerda) e Álcool (direita) positivos e negativos. (Fonte: Arquivo pessoal)

Assim os resultados para a prova do alizarol eram compostos por duas variáveis, uma referente a formação de grumos e a outra em relação a acidez, enquanto, no teste do álcool era caracterizada apenas uma variável referente a formação de grumos, classificada em positiva ou negativa.

O objetivo de ambos os testes, pensando em sua realização a campo ou em um laticínio, é avaliar a estabilidade do leite, que serve de certa forma como indicativo de contaminação, principalmente por microrganismos mesófilos. O descarte de leites com resultados positivos evita o processamento de leites com baixa qualidade microbiológica, bem como, que ocorra coagulação do fluido dentro do pasteurizador, já que, os testes são uma forma de simular a estabilidade do leite quando submetido ao calor.

4.1.2 Análise de microrganismos mesófilos

Primeiramente, antes de iniciar a análise, o frasco que continha a amostra era aberto na capela, e em seguida era realizada a flambagem de sua borda.

Com o auxílio de uma pipeta automática, era pipetado 1 ml de leite e dispensado em um tubo de ensaio que continha 9 ml de solução salina estéril. A partir desta diluição era pipetado 1 ml da solução em um outro tubo de ensaio contendo

novamente 9 ml de solução salina estéril, realizando-se este procedimento sucessiva vezes, até que fosse obtido o número de diluições desejadas.

Posteriormente, eram elegidas as diluições a serem submetidas ao plaqueamento, realizando-se o plaqueamento em profundidade em Ágar Padrão para Contagem (PCA). Para isto, com o auxílio de uma pipeta, depositava-se 1ml da diluição selecionada em uma placa de Petri e adicionava-se PCA ainda fundido (em torno de 45°C), procedendo-se a homogeneização por meio de 8 movimentos circulares no sentido horário, 8 no sentido anti-horário e mais 8 movimentos em forma de oito.

Após a solidificação, as placas eram incubadas a 35-37°C durante um intervalo de 48 horas, período após o qual era feita a contagem das colônias.

4.1.3 *Análise de microrganismos psicrotróficos proteolíticos*

Esta análise iniciava-se de forma semelhante a anterior, efetuando-se as diluições nas mesmas proporções, de modo que as culturas possibilitassem uma segura contagem de colônias. Em seguida, era realizada a transferência de 0,1ml de solução para uma placa de Petri contendo Ágar Leite utilizando uma alça de Dregalski para distribuir o inóculo uniformemente na placa até a completa absorção da suspensão pelo ágar.

As placas eram então conduzidas a incubação, por um período de 10 dias a uma temperatura de 7°C. Após este período eram encaminhadas a leitura. Eram consideradas todas as colônias para se obter a contagem de psicrotróficos, e aquelas que apresentassem ao seu redor halo de proteólise (halo translúcido) eram consideradas proteolíticas, assim como é possível observar na Figura 2.



Figura 2: Ágar Leite apresentando colônias características de microrganismos proteolíticos. (Fonte: Arquivo pessoal)

4.1.4 Análise de bactérias ácido lácticas

Primeiramente, na capela da sala de pesagem, realizavam-se as diluições, de forma semelhante as duas análises anteriores. Assim sendo, em um tubo ensaio contendo 9 ml de solução salina estéril, eram dispensados 1 ml de amostra, obtendo-se desta forma, a primeira diluição. Esse procedimento era realizado sucessivamente, até que fossem obtidas as diluições desejadas.

As diluições a serem utilizadas na sequência da análise eram selecionadas de forma subjetiva, tomando por base os resultados anteriores para a mesma coleta de maneira que se obtivesse uma contagem de colônias reduzida nas placas. Este procedimento era realizado tanto para facilitar a contagem, quanto para propiciar uma melhor visualização das colônias responsáveis pela inibição local do crescimento do microrganismo indicador adicionado posteriormente.

A partir de cada diluição selecionada, eram dispensados 0,1 ml em placas de Petri contendo Ágar Lactobacillus segundo Man, Rogosa e Sharpe (MRS), promovendo-se a distribuição através da utilização de uma alça de Drigalski, até que o ágar absorve-se de forma completa a amostra.

Na sequência, eram adicionados a cada placa inoculada uma fina camada de ágar-ágar, objetivando promover um ambiente de microaérofilia para favorecer o crescimento de bactérias ácido lácticas. Após a solidificação do ágar-ágar, as placas eram incubadas a 30 °C por 48 horas.

Decorrido o período de incubação, era procedida a contagem placas, atentando-se para selecionar aquelas que haviam possibilitado a contagem direta e que apresentassem um adequado isolamento de colônias.

Após a seleção, era adicionada às placas escolhidas uma terceira camada composta por ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e por um microrganismo indicador, neste caso *Listeria monocytogenes*. Aguardava-se a solidificação da terceira camada, e conduzia-se as placas a uma segunda incubação, por 24 horas a 37°C. A concentração do microrganismo indicador era padronizada a partir da incubação do mesmo em caldo BHI por 24 horas, ou até que o caldo apresentasse turbidez, seguida da diluição de 2 ml deste inóculo em 13 ml de ágar BHI em tubos Falcon, procedimento após o qual era realizada a homogeneização do conteúdo por meio de repetidas inversões.

Após o referido período, as placas eram avaliadas e selecionadas segundo a produção de halos de inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* (Figura3). Estes halos são caracterizados por se apresentarem como áreas translúcidas circunscritas às colônias.

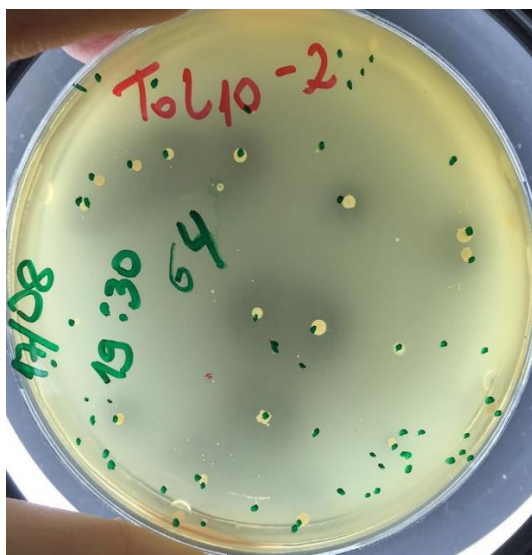


Figura 3: Ágar MRS apresentando halos de inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* (Fonte: Jhennifer Schimiedt).

Das colônias formadoras de halo, selecionavam-se aquelas que exibissem um isolamento adequado. Eram portanto, repicadas em tubos de ensaio contendo MRS (Figura 4) e incubadas a 30°C por 24 horas.



Figura 4: Caldo MRS
(Fonte:Jhennifer Schimiedt).

Posteriormente, a partir de cada um dos tubos, realizava-se o estriamento em placas de ágar MRS. Efetuava-se uma nova incubação, por um intervalo de 24-48 horas, período após o qual eram efetuados testes de coloração de Gram e de catalase.

Para as cepas que exibissem características de bactérias ácido lácticas, isto é, catalase negativas e Gram positivas, realizava-se a transferência a partir dos respectivos tubos de caldo MRS, de uma alçada de colônia característica para um endorff com caldo MRS (Figura 5), que após incubação, recebia a adição de glicerol como fator crioprotetor, para o armazenamento.

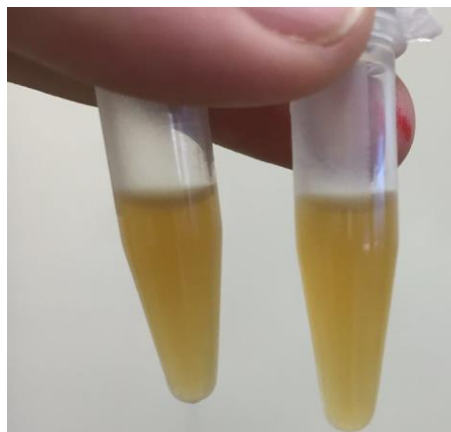


Figura 5: Microtubos pré armazenamento (Fonte: Jhennifer Schimiedt).

4.1.5 Crioscopia

O índice crioscópico pode ser definido como a aferição do ponto de congelamento do leite, que é realizado com o objetivo de verificar possíveis adulterações, como a adição de água. O ponto de congelamento do leite é mais baixo que o ponto da água, e isto ocorre devido a sua composição (CARDOSO; ARAÚJO, 2003). Quando ocorre a adição de água ao leite, o índice crioscópico tende a se aproximar de 0, que é o ponto de congelamento da água, e isso advém da diluição dos componentes presentes no leite, como a lactose e os sais minerais. O inverso acontece com a adição de componentes com baixo ponto de congelamento, como o álcool, por exemplo.

A análise de crioscopia era realizada por meio de um crioscópio eletrônico digital (Figura 6), que inicialmente era calibrado utilizando-se 2 substâncias padrões. Essas substâncias eram inseridas em 2 tubos de crioscopia e conduzidas ao crioscópio, para a realização da calibragem conforme a configuração do equipamento.

Após a calibragem, eram transferidos 5 ml da amostra para dois tubos de crioscopia, em duplicata, de modo que cada tubo contivesse 2,5 ml de leite. Em seguida conduzia-se cada um dos tubos ao crioscópio eletrônico.



Figura 6: Crioscópio Eletrônico (Fonte: Arquivo pessoal).

A partir de então o crioscópio realizava o resfriamento do fluido até a temperatura - 3°C, e na sequência, por meio de vibrações mecânicas, o aparelho proporcionava uma rápida elevação da temperatura do leite, o que provocava a liberação do calor de fusão, até que se alcançasse o “plateau”, que nada mais é do que ponto de congelamento do líquido que estava sendo avaliado (TRONCO, 1997).

Efetua-se a leitura do índice crioscópico para cada um dos dois tubos, e comparava-se o valor encontrado com o valor padrão. De acordo a legislação vigente, o leite deve apresentar índice crioscópico de -0,530 H° a -0,550 H°, sendo considerado esse intervalo como o valor padrão para o Leite (BRASIL,2011).

4.1.6 Determinação de acidez

Denomina-se leite, o fluido proveniente de ordenha que exiba parâmetros físico-químicos e microbiológicos em conformidade com a Instrução Normativa nº 62 do MAPA.

Dentre estes parâmetros, a acidez do leite normal deve ser avaliada cumulativamente a outras características físico químicas e microbiológicas, de modo que, só será admitido, segundo a legislação, leites com acidez entre 14 e 18°D (BRASIL,2011).

O leite recém ordenado apresenta uma acidez natural, proveniente de seus componentes, como albumina, citratos, caseínas e fosfatos. A lactose, principal

carboidrato do leite, é um composto potencialmente fermentável pelos microrganismos, que a partir da fermentação ocasionam a formação de ácidos, em especial o ácido láctico.

Por isso, a análise da acidez do leite, torna-se uma ferramenta fundamental, uma vez que, remete sobre as condições higiênicas sanitárias que o mesmo foi exposto.

Para essa avaliação, em um béquer adicionavam-se 10 ml de leite, seguidos da adição de 5 gotas de fenolftaleína, prosseguindo-se com a homogeneização da solução. A análise era realizada em duplicata para cada amostra.

Realizava-se, em sequência, a adição gradual de solução Dornic, até que se obtivesse a viragem de cor, caracterizada pela persistente coloração rósea.

Realizava-se a leitura levando em conta a quantidade necessária para neutralizar a acidez da mostra, e provocar a viragem de cor do indicador de pH, considerando 0,1 ml de solução Dornic equivale a 1°D.

4.2 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Foi realizado o acompanhamento de protocolo de extração de DNA de culturas de *Salmonella* sp. referente ao projeto de mestrado da discente Karlize Cristina Smith Dianin, do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

A extração de DNA do gênero *Salmonella* era realizada por meio da utilização de um kit comercial para tal finalidade, denominado Kit Promega, que é utilizado para a extração de DNA de bactérias Gram negativas.

Primeiramente era dispensado em um microtubo estéril de primeiro uso de 1,5 ml, 1 ml de caldo BHI contendo uma cultura pura de *Salmonella* sp. O procedimento era realizado para cerca de 20 cepas simultaneamente, isto devido a capacidade da centrífuga.

Para o processo de extração efetivamente, os microtubos eram centrifugados por 2 minutos, a velocidade máxima da centrífuga que era de 14.000 giros por minuto.

Após este procedimento, observava-se a formação de um pellet no fundo do microtubo e, vertendo o microtubo descartava-se o sobrenadante.

Em seguida eram pipetados, com o auxílio de uma pipeta automática, 600µl de Nuclei Lysis Solution (Figura 7) e adicionados ao microtubo, tendo o cuidado para homogeneizar e ressuspender o Pellet. Após tal procedimento, o microtubo era destinado a incubação em um banho-maria e lá permanecia por 5 minutos a 80°C. Aguardava-se até que os microtubos retornassem a temperatura ambiente. O objetivo desta etapa era promover a lise da membrana plasmática e nucléica dos microrganismos, propiciando a exposição do material genético.

Decorrido o esfriamento, era adicionado 3µl de RNase solution (Figura 8) a cada microtubo, novamente atentando-se para homogeneizar a solução com o auxílio da ponteira. Logo após, os microtubos eram fechados e a grade vertida 2 a 3 vezes e os tubos reconduzidos a incubação, desta vez, por 30 minutos a 37°C, aguardando-se o resfriamento após o referido período até a temperatura ambiente. A finalidade deste processo, era lisar as fitas de ácido ribonucleico (RNA) para que elas não interferissem nos testes de biologia molecular.

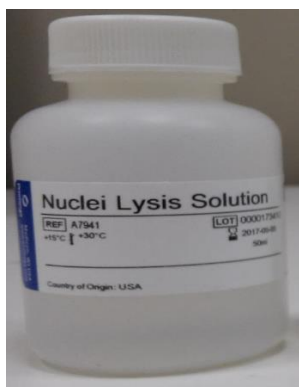


Figura 7: Nuclei Lysis Solution (Fonte: arquivo pessoal).



Figura 8: Solução de RNase (Fonte:Arquivo pessoal).

Após a lise celular, promovia-se a precipitação proteica através da adição de 200 µl de Protein Precipitation Solution (Figura 9), seguida de agitação por 20 segundos, etapa que era realizada utilizando-se um Vortex. A solução já agitada passava por um processo de resfriamento por 5 minutos, que era proporcionado utilizando-se gelo. Logo após, a solução resfriada era dirigida a centrifuga, onde

permanecia por 3 minutos a velocidade máxima. Desta forma, segregavam-se as proteínas, mantendo o material genético em solução.

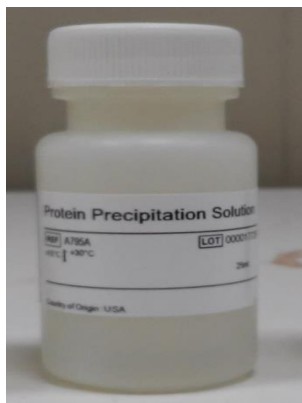


Figura 9: Protein Precipitation Solution (Fonte: Arquivo pessoal).

Na sequência, o sobrenadante era transferido para um novo microtubo que continha 600µl de isopropanol, cuidando no momento da aspiração para não contaminar a solução de DNA com a proteína já precipitada. Posteriormente, promovia-se a inversão dos tubos algumas vezes e era possível observar “fios de DNA”. Era realizada então, mais uma centrifugação por 2 minutos, a velocidade máxima, seguida do descarte do sobrenadante resultante.

A adição de etanol 70% era realizada na sequência, sendo adicionado no volume de 600µl, com posterior homogeneização.

Após a homogeneização, a solução era direcionada a centrifuga mais uma vez, por um período de 2 minutos a velocidade máxima. Em seguida, removia-se o etanol com o auxílio de uma pipeta e aguardava-se a completa secagem dos tubos, por meio da utilização de uma estufa para esse fim.

A partir de então, era realizada a reidratação do pellet, utilizando-se 100µl de DNA Rehydration Solution (Figura 10). A solução era conduzida ao banho-maria por 1 hora a 65°C ou ao refrigerador overnight a 4°C, período após o qual realizava-se a leitura em um aparelho denominado NANODROP, que apresentava por função avaliar a qualidade do processo de extração, já que, as amostras seriam futuramente encaminhadas para a realização de análises de biologia molecular.

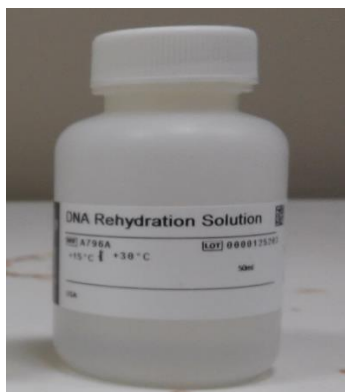


Figura 10: DNA Rehydration solution (Fonte: Arquivo pessoal).

4.3 Análise de *Salmonella* spp em ovos

Este protocolo analítico esteve relacionado a rotina de trabalho de prestação de serviços do LACOMA.

O diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* spp em ovos era fundamentado na técnica bacteriológica regida pela Portaria 126 do MAPA, onde consta o procedimento oficial para o diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* em ovos.

A técnica é composta basicamente por 6 etapas: enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, isolamento, identificação bioquímica preliminar, identificação bioquímica complementar e sorologia.

Como as amostras submetidas ao teste durante o estágio não foram características, não haverá a descrição da sorologia, pois esta etapa não foi acompanhada no decorrer das atividades.

4.3.1 Pré-enriquecimento

O enriquecimento não seletivo tem por objetivo recuperar as células injuriadas presentes na amostra, sem proporcionar a seleção de qualquer microrganismo. Na

análise de *Salmonella*, utilizava-se a Água Peptonada Tamponada (APT) como meio não seletivo, pois esse composto é rico em nutrientes e aminoácidos essenciais para a manutenção e revitalização dos microrganismos.

Primeiramente, os ovos eram submetidos a desinfecção da casca, através da imersão em álcool iodado, para posteriormente serem abertos para a análise. Em seguida, eram abertos com o auxílio de uma pinça previamente flambada, e depositados em uma saco estéril, onde era realizado a princípio uma homogeneização manual. Empregava-se uma proveta de vidro previamente esterilizada para a realização da diluição da amostra, na proporção de 1 para 10. Eram transferidos 25 ml da solução de ovos para um outro saco Nasco, onde acrescentava-se 225 ml de APT. A cultura era encaminhada a incubação a 36°C por um período de 24h.

4.3.2 Enriquecimento seletivo

Posteriormente ao enriquecimento não seletivo, era realizado o enriquecimento seletivo, caracterizado como um procedimento que visa selecionar os microrganismos presentes na amostra. Esta etapa era realizada em dois meios seletivos distintos, assim como determina a Portaria 126 do MAPA, sendo eles: Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) e Caldo Tetracionato (TT).

O RVS (Figura 11) é constituído por verde de malaquita e cloreto de magnésio, substâncias responsáveis pela inibição da flora acompanhante. O caldo apresenta também digestão péptica de farinha de soja, o que possibilitava o crescimento de *Salmonella* spp.



Figura 11: Caldo RVS
(Fonte: Arquivo pessoal).

Já o TT (Figura 12) é composto por sais de bile, substância que provoca a inibição de microrganismos Gram positivos, o que somado a adição de solução de iodo-iodeto, com conseqüente formação de tetrationato, auxilia na seleção de microrganismos comumente presentes na flora intestinal de múltiplas espécies. É constituído também por peptonas e minerais, o que possibilitava o crescimento do microrganismo desejado.



Figura 12: Caldo TT
(Fonte: Arquivo pessoal).

Eram transferidos 100 microlitros da cultura para 1 tubo de ensaio que continha 10 ml de RVS, e 1000 microlitros para um tubo que continha 10 ml de TT. Após a transferência, os tubos eram dirigidos a incubação, onde permaneciam por 18-24 horas a temperatura 42°C e 36°C, respectivamente.

4.3.3 Plaqueamento seletivo diferencial

Após a incubação dos caldos seletivos, procedia-se ao plaqueamento seletivo diferencial, que consistia no estriamento de duas placas de Petri, a partir das culturas, uma que continha ágar Desoxicolato-Lisina-Xilose (XLD), e outra composta por ágar Bismuto Sulfito (BS).

O ágar XLD (Figura 13) é composto por extrato de levedura, que constitui a principal fonte de nutrientes e vitaminas do meio. Já a presença de Desoxicolato de Sódio proporciona a inibição do crescimento de bactérias Gram positivas. O Ágar ainda é composto por xilose, lisina, sacarose e outras substâncias que possibilitam uma boa expressão do gênero *Salmonella*.

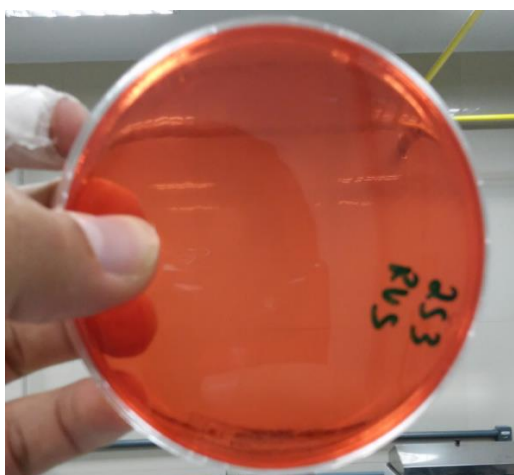


Figura 13: Ágar XLD (Fonte: Arquivo pessoal).

O grupo *Salmonella* se expressa no Ágar XLD através de colônias vermelhas providas de um centro negro, além de promover o aparecimento de uma coloração vermelho cereja no meio. Era efetuada a leitura das placas, e a partir do aparecimento

destas colônias características do gênero, caracterizava-se o plaqueamento como característico.

O ágar BS (Figura 14) é um meio altamente seletivo para o isolamento do gênero *Salmonella*, constituído por verde brilhante para a inibição da microbiota competidora, dextrose, peptona e extrato de carne como fontes de nutrientes, além de apresentar outros compostos como o sulfato ferroso e o indicador bismuto sulfito.

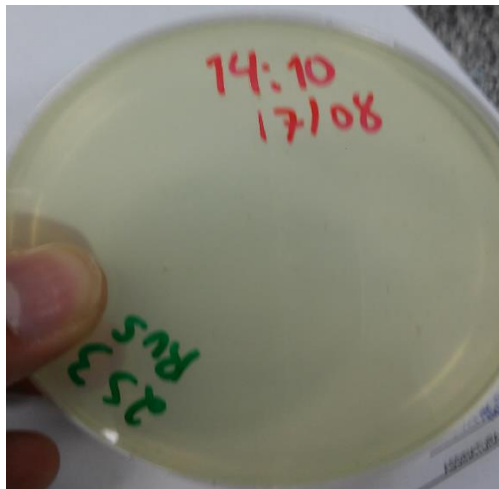


Figura14: Ágar BS (Fonte: Arquivo pessoal).

Quando presentes no isolamento em ágar BS, o gênero se expressa por meio do aparecimento de colônias enegrecidas com brilho metálico, considerando tais colônias como características.

As placas de ambos os meios eram direcionadas a incubação após serem estriadas, por um intervalo de 24 horas a temperatura de 35-37°C.

4.3.4 Provas bioquímicas

Para a avaliação bioquímica das amostras, eram realizadas provas bioquímicas específicas com o intuito de verificar o comportamento dos microrganismos presentes, em relação aos diferentes compostos. Eram testados em relação a capacidade de metabolizar carboidratos e aminoácidos, produzir indol e sulfeto, entre outras características.

4.3.4.1 Exame bioquímico preliminar

Após a leitura das placas, e verificado o crescimento de colônias características de *Salmonella* spp, era procedido ao exame bioquímico preliminar, que consistia no repique de 3 a 5 colônias características nos meios Ágar tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA).

Eram portanto, repicadas 3 a 5 colônias presentes no XLD para um tubo de ensaio contendo LIA, e em seguida realizava-se o mesmo procedimento para o TSI. A partir do isolamento presente no ágar BS, era efetuado o repique para os mesmos meios de cultura citados anteriormente. Os tubos já repicados eram incubados a 35-37°C por um período de 18-24 horas.

O Ágar Lisina Ferro (Figura 15) é um meio seletivo, composto basicamente por glicose, lisina, citrato férrico de amônia e purpura de bromocresol, compostos que permitem a verificação da descarboxilação e desaminação da lisina, por meio da alteração de pH que é evidenciada pelo indicador purpura de bromocresol.

Na reação era avaliada a presença das enzimas lisina descarboxilase (descarboxilação) e lisina desaminase (desaminação). Desta forma, após a incubação era possível verificar a descarboxilação e/ou desaminação da lisina, através da alteração de pH que era expressa no meio por alterações de coloração.

Na descarboxilação da Lisina a base do tubo torna-se alcalina, o que é evidenciada pela tonalidade purpura. Já a coloração amarela é indicativa de acidez, e sugere apenas o consumo da glicose. A desaminação é expressa pela coloração vermelha acobreada na ápice do tubo e a produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), pode ser identificada pela coloração enegrecida que comumente se desenvolve da base do tubo em direção ao centro.



Figura 15: LIA com presença de lisina descarboxilase e sulfeto de hidrogênio (Fonte: Daiana Rosa).

O ágar Tríplice Açúcar Ferro (Figura 16) é constituído essencialmente por glicose, sacarose e lactose. Além dos três açúcares, o meio apresenta fontes de aminoácidos, o indicador de pH vermelho de fenol e o sulfato de ferro, composto que possibilita a detecção da produção do H_2S .

Dentre os três carboidratos presentes no meio, apenas a glicose é passível de metabolização pelo gênero *Salmonella*, sendo os demais carboidratos não fermentados pelo grupo. Como a glicose apresenta-se em menor quantidade no meio, após esgotar-se, o gênero é obrigado a consumir aminoácidos para obter energia. Desta forma, quando a glicose é consumida, o meio adquire tonalidade amarela, pois encontra-se ácido. Após o consumo total da glicose, o meio adquire uma tonalidade avermelhada, resultante do consumo de aminoácidos, fato que torna o meio alcalino através da liberação de aminas. A liberação de aminas, por sua vez, é facilitada em anaerobiose, e por isso a alcalinização do meio ocorre no sentido do bisel para a base.

A capacidade de produzir sulfeto de hidrogênio a partir do enxofre presente no meio também era avaliada, fato que pode ser visualizado, pois o meio expõe uma tonalidade enegrecida.



Figura 16: TSI com consumo de glicose, presença de sulfeto de hidrogênio e gás (Fonte: Daiana Rosa).

O exame bioquímico preliminar era interpretado de acordo a tabela a seguir:

Tabela 1: Identificação bioquímica presuntiva de *Salmonella* spp.

Comportamento Bioquímico		<i>Salmonella</i> sp. sub-espécie I	<i>Salmonella</i> Pullorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp. Sub-espécies III a e IIIB
TSI 24 horas	Base	A Gás +	A Gás +/-	A Gás -	A Gás +
	Bisel	V	V	V	V ou A
	H ₂ S	+	+/-	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P	P
	H ₂ S	+	+/-	+	+

- *Salmonella* sp sub espécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras)

- *Salmonella* sp sub espécie III a e III b - Antigo grupo Arizona

- A : amarelo (ácido) ; V: vermelho (alcalino); P: púrpura (alcalino).

Fonte: BRASIL, 1995

De acordo com a interpretação da tabela, e verificada reações características de *Salmonella*, procedia-se ao exame bioquímico complementar.

4.3.4.2 Exame bioquímico complementar

O exame bioquímico complementar era realizado sempre que houvesse desenvolvimento de reações características de *Salmonella* spp no exame bioquímico preliminar. A partir do inóculo presente no LIA, era efetuada provas bioquímicas nos seguintes meios: Caldo Malonato, Caldo Uréia, Ágar Citrato de Simmons, MRVP e Meio de motilidade, Indol e sulfeto (SIM).

Tais meios eram semeados e posteriormente incubados por 18-24 horas a temperatura de 35-37°C, excetuando-se o Ágar Citrato de Simmons, o caldo MRVP e o caldo Malonato, que apresentam tempos de incubação distintos, de 96 horas, 48 horas e 48 horas, respectivamente. Cabe salientar que a leitura do citrato pode ser realizada a partir de 24 horas, desde que o resultado seja positivo. Para a constatação de resultado negativo, deve-se aguardar o intervalo de 96 horas.

4.3.4.2.1 Caldo Malonato

O Caldo Malonato (Figura 17) tem por finalidade avaliar a capacidade dos microrganismos em utilizar o malonato presente como única fonte de carbono. Avalia também, a aptidão para metabolização do sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio, o que provoca a formação de hidróxido de sódio, composto responsável pela alcalinização do meio. Além de malonato e sulfato de amônio, o caldo apresenta o indicador de pH azul de bromotimol, composto que revela a alcalinidade do meio, quando o inóculo é capaz de metabolizar o malonato e o sulfato de amônio. Desta forma, o meio deixa de apresentar a coloração verde e adquire a coloração azul.



Figura 17: Caldo Malonato positivo
(Fonte: Daiana Rosa).

Algumas cepas apresentam a capacidade de utilizar o malonato e o sulfato de amônio, como fontes de carbono e nitrogênio, cepas que eram abrangidas no antigo grupo Arizona, atualmente classificadas como sub espécie III A e III B. São negativas a prova, as seguintes cepas: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*.

4.3.4.2.2 Caldo Uréia

O Caldo Uréia é um composto utilizado para a identificação da enzima urease, enzima esta capaz de hidrolisar a ureia. Quando o microrganismo semeado é capaz de produzir a referida enzima, ocorre a hidrólise da uréia, o que acarreta na formação de amônia, um composto alcalino que promove a alcalinização do meio. Como o caldo apresenta o indicador de pH vermelho de fenol, quando ocorre a alcalinização, o meio deixa a coloração amarelo palha e adquire coloração Pink, assim como é possível visualizar na Figura 18.

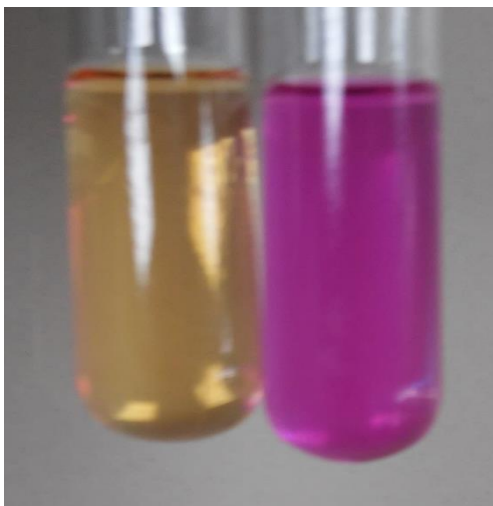


Figura 18: Caldo Uréia, urease negativo e positivo (Fonte: Arquivo pessoal).

Como os sorotipos do grupo *Salmonella* são incapazes de hidrolisar a uréia, era verificada a ausência de *Salmonella* sempre que houvesse alcalinização do meio.

4.3.4.2.3 Ágar Citrato de Simmons

Com exceção de *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, os demais sorotipos do gênero expressam a capacidade de obter energia a partir do citrato, utilizando este como única fonte de carbono.

O Ágar Citrato de Sinmons (Figura 19) apresenta os seguintes constituintes: citrato de sódio para a obtenção de carbono, sal amônio como fonte de nitrogênio e azul de bromotimol como indicador de pH.

Os microrganismos hábeis a utilizar o citrato como única fonte de carbono, também são capazes de utilizar o sal amônio como fonte de nitrogênio. A degradação do sal amônio gera a formação de hidróxido de amônia, o que resulta na alcalinização do meio. Resultante a alteração de pH, o meio deixa de apresentar a tonalidade verde e adquire coloração azul.



Figura 19: Ágar Citrato de Simmons positivo (Fonte: Arquivo pessoal).

Como a maioria das cepas são aptas a utilizar o citrato como fonte de carbono, tanto reações com utilização do citrato (positivo), quanto reações sem utilização do citrato (negativa) podem ser sugestivas para *Salmonella* spp.

4.3.4.2.4 Caldo MRVP

O caldo MRVP também conhecido como Meio de Clark e Lubs, é um caldo comumente utilizado para a diferenciação de microrganismos, fundamentado nos Testes de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer.

O Teste do Vermelho de Metila (Figura 20) verifica a habilidade do inóculo em metabolizar a glicose pela via ácido mista, com conseqüente acidificação do meio, que pode ser observada devido a adição do indicador de pH vermelho de metila. Quando ocorre a acidificação, o caldo deixa sua coloração original (amarelo) e adquire coloração avermelhada.

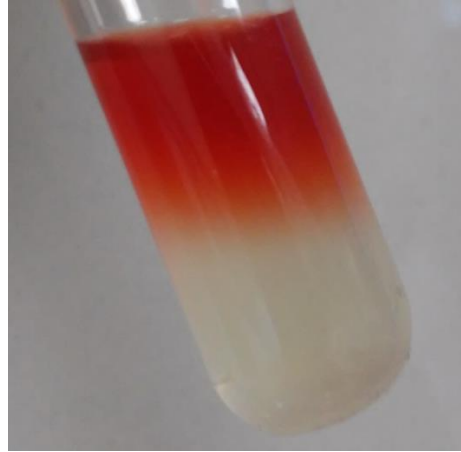


Figura 20: Teste VM positivo (Fonte: Arquivo Pessoal)

O Teste de Voges-Proskauer (Figura 21) é utilizado para identificação de microrganismos capazes de obter energia pela via butilenoglicólica. Quando essa capacidade está presente ocorre formação de acetoína, que associada a adição de hidróxido de potássio (200 μ l) e a presença de oxigênio é convertida a diacetila. A diacetila, por sua vez, é convertida em um complexo vermelho por meio da adição de alfa naftol (600 μ l), complexo que se forma em anel.

Assim sendo, sempre que a via butilenoglicólica é utilizada para a obtenção de energia, é possível visualizar a formação de um anel de tom vermelho no caldo.

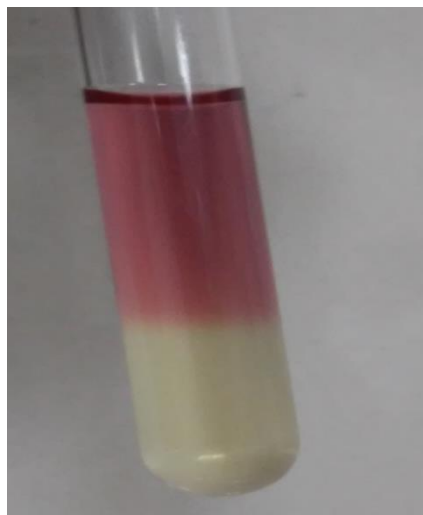


Figura 21: Teste VP positivo (Fonte: Arquivo pessoal).

No gênero *Salmonella*, todos os sorotipos são capazes de utilizar a glicose pela via ácido mista, por isso são todos positivos ao teste do vermelho de metila. Já a via butilenoglicólica não é utilizada pelo grupo, sendo o teste negativo para qualquer sorotipo.

4.3.4.2.5 Meio de Motilidade, Indol e Sulfeto

O meio SIM (Figura 22) é utilizado para a verificação da motilidade, produção de Indol e produção de H₂S. Quando microrganismos móveis são inoculados, ocorre a migração destes além da linha de inoculação, o que ocasiona a turbidez do meio.

Já a reação de Indol podia ser observada através da adição do reagente de Kovacs, que na presença de Indol, ocasionava a formação de um anel de coloração rosa na superfície do meio. Este teste tem por finalidade avaliar a capacidade do microrganismo em quebrar o triptofano, isto é, em produzir a enzima triptofanase. A partir da quebra, há a liberação de vários metabólitos, sendo um deles o Indol.

A formação de H₂S era constatada sempre que ocorria a distribuição de uma coloração enegrecida pelo meio, que podia se estender por todo o meio (motilidade positiva) ou apenas pela linha de inoculação (motilidade negativa).



Figura 22: Meio SIM, Indol e sulfeto positivos, motilidade negativa (Fonte: Arquivo pessoal).

A maior parte dos sorotipos de *Salmonella* são negativos ao teste de Indol, deste modo, sempre que era verificada reação positiva, a possibilidade de presença *Salmonella* tornava-se remota.

No que tange a motilidade, a maior parte dos sorovares são móveis, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são negativas ao teste de motilidade.

4.4 Análise de Potabilidade de Água

4.4.1 Coliformes

Para avaliação da potabilidade de água, era utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), também denominado método dos tubos múltiplos. Este teste fundamenta-se nas características do grupo: bastonetes Gram negativos, que produzem gás e ácido a partir da fermentação da lactose.

O primeiro caldo utilizado era o Lauril Sulfato Triptose (LST), que apresenta a lactose como principal fonte de carbono, e o lauril sulfato como inibidor da flora acompanhante. A avaliação da fermentação por meio do tubo de Duran constituía o teste presuntivo para a detecção de microrganismos fermentadores de lactose.

O segundo caldo utilizado era o caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL), onde a bile bovina e o corante verde brilhante funcionam como inibidores da microbiota competitiva. Além dos inibidores, o caldo também apresenta lactose, a fim de verificar a fermentação, com conseguinte formação de ácido e gás. A utilização deste caldo fundava o teste confirmativo para detecção de coliformes totais.

O terceiro caldo semeado era o caldo EC, afim de distinguir coliformes totais de coliformes termotolerantes. Por isso sua temperatura de incubação era diferente dos demais caldos.

As amostras de água recebiam tratamento prévio com tiosulfato, e adentravam o laboratório acondicionadas em frascos de vidros fechados, que recebiam esterilização prévia a coleta.

Após a chegada, as amostras eram direcionadas para a sala de pesagem, onde com o auxílio de uma pipeta, era realizada a transferência de 100 ml de água para 10 tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo (LST) dupla concentração, atentando-se para transferir 10 ml para cada tubo. Além de LST, os tubos apresentavam em seu interior um tubo de Durhan invertido, que era inserido com objetivo de facilitar a identificação da produção de gás.

Os tubos eram dirigidos a incubação, a 35-37°C por um período de 24-48 horas. Em seguida era realizada a leitura, que consistia em avaliar se havia ocorrido produção de gás pelo inóculo. Os tubos que não apresentavam formação de gás eram reconduzidos a incubação por mais 24 horas.

Dos tubos positivos a formação de gás, era realizada a semeadura de uma alçada para um tubo de ensaio contendo 3 ml de VBBL 2%. Em seguida, realizava-se o mesmo procedimento para um tubo de ensaio que continha 3 ml de caldo EC. Ambos os tubos também continham em seu interior um tubo de Duran invertido para facilitar a visualização da formação de gás, assim como ilustra a Figura 23.

O caldo EC já inoculado era submetido a incubação a 44,5°C por 24-48 horas, para a avaliação do crescimento de coliformes termotolerantes. Já o VBBL contendo o inóculo era incubado a 35-37°C, por um intervalo de 24-48 horas, com o objetivo de verificar a presença de coliformes totais.

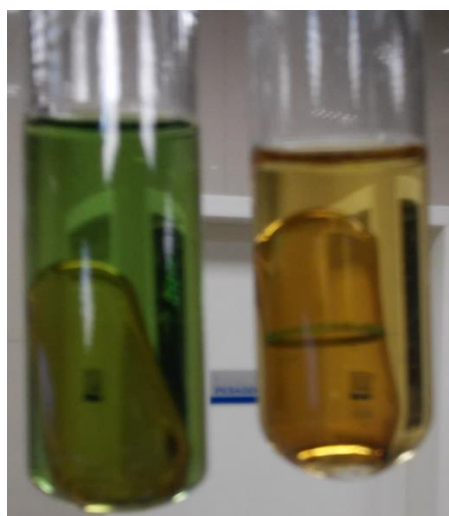


Figura 23: Caldo VBBL e Caldo EC
(Fonte: Arquivo pessoal).

4.4.1.1 Teste confirmatório de *E.coli*

Para a confirmação da presença de *E.coli*, utilizava-se o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), caracterizado por ser um meio seletivo que permite a visualização da fermentação da lactose pelas bactérias, em especial a *E.coli*, que presente no ágar desenvolve colônias enegrecidas com um característico brilho metálico esverdeado.

A partir dos caldos EC positivos eram estriadas placas de Ágar EMB (Figura 24), sendo utilizada uma placa para cada tubo. Posteriormente, realizava-se a incubação por 18-24 horas, a uma temperatura de 35-37°C

Eram consideradas características as amostras que, se desenvolvessem no ágar com formação de colônias enegrecidas com o característico verde metálico.

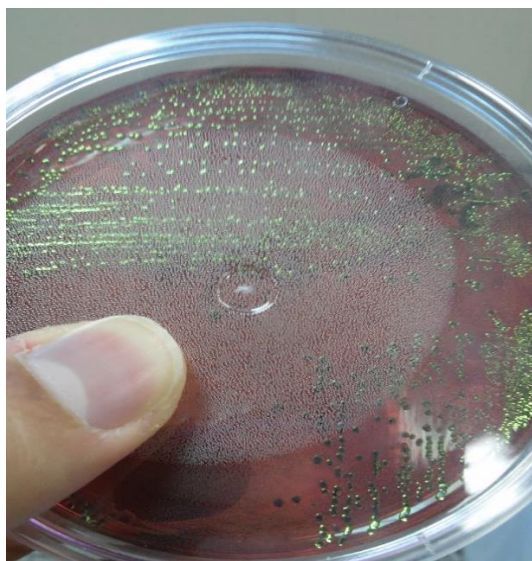


Figura 24: Ágar EMB apresentando colônias características de *E.coli* (Fonte: Arquivo pessoal).

4.4.1.2 Resultados

Para coliformes totais (VBBL) e termotolerantes (EC), contavam-se os tubos positivos, e comparava-se com a tabela NMP, podendo os resultados serem expedidos em NMP por 100 ml, ou em presença/ausência em 100 ml (BRASIL,2011).

Já para o teste confirmatório de *E.coli* o resultado era expedido como presença/ausência de *E. coli* em 100 ml (BRASIL,2011).

4.4.2 Análise de mesófilos

Para análise de microrganismos mesófilos, era utilizada a técnica de plaqueamento em profundidade em PCA, ou seja, transferia-se 1 ml da amostra para uma placa de Petri estéril, e adicionava-se cerca de 15 ml de PCA fundido a aproximadamente 45°C.

Posteriormente, as placas eram levadas a incubação por 48 horas a 35-37°C, período após o qual era feita a contagem das placas, considerando todas as colônias presentes.

5. CONCLUSÃO

A necessidade do controle de contaminantes na indústria alimentícia intensificou-se nos últimos anos, demandando por parte dos profissionais da Medicina Veterinária uma atenção especial a esse setor.

O isolamento precoce de possíveis contaminantes em água e alimentos, constitui o principal mecanismo de prevenção de DTAS. Neste cenário a atuação do médico veterinário revelou-se de suma importância para a saúde pública, uma vez que, é um profissional completo para atuar no isolamento de microrganismos patogênicos e na saúde humana e animal.

O estágio supervisionado obrigatório apresenta por principal finalidade preparar o graduando para a inserção no mercado de trabalho, proporcionando a este uma preparação prévia para as adversidades que surgirão durante o desempenho de suas atividades profissionais.

É fato que as atividades realizadas no decorrer da graduação são distintas daquelas desempenhadas no decorrer da carreira profissional, pois durante a graduação, os alunos estão constantemente assistidos pelos seus mestres, o que não acontece no mercado de trabalho. Assim sendo, o estágio possibilita ao acadêmico uma nova visão sobre o desempenho de suas atividades, que a partir de então, não serão mais assistidas pelos docentes.

O estágio serviu ao seu propósito, pois me proporcionou conhecer a rotina de profissionais residentes da Medicina Veterinária que, mesmo estando inseridos em um ambiente acadêmico, vivenciam um método de aprendizagem muito mais ativo, quando comparado a aquele desenvolvido durante a graduação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2004. Brasília

BRASIL. Ministério da Saúde. **Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Portaria nº 2.914, 12 de Dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias**. Portaria nº 126, 03 de novembro de 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Cru Refrigerado, Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel**. Instrução Normativa nº 62, 29 de dezembro de 2011.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. **Parâmetros de qualidade em leites comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 17, n. 114/115, p. 34-40, 2003

CARVALHO, I. T. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GERMANO, P.M.L; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P.C; FISCHER, B.D. **Microbiologia Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

KONEMAN, E. et al. **Koneman, Diagnostico Microbiológico: Texto e Atlas**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

PELCZAR, M.J et al. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Person Education, 2009.

ROSA, C. M. A. **Vigilância das doenças transmitidas por alimentos**. 2008.
Disponível em:
http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=410

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 151p.