

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO COLISURE™ NA ENUMERAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI* EM LEITE PASTEURIZADO

VANERLI BELOTI¹
MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA BARROS²
LUÍS AUGUSTO NERO³
ELSA HELENA WALTER DE SANTANA³
JULIANA APARECIDA DE SOUZA³
BERNADETTE DORA GOMBOSSY MELO FRANCO⁴

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W. DE; SOUZA, J. A. DE; FRANCO, B. D. G. M. Avaliação do desempenho do ColiSure™ na enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* em leite pasteurizado. *Semina: Ci. Agrárias*, Londrina, v. 21, n. 1, p. 15-18, mar. 2000.

RESUMO: Na indústria láctea a detecção de microrganismos do grupo coliformes é utilizada como indicativo da higiene na produção do leite e de contaminação pós-pasteurização. Os métodos tradicionais para a enumeração de coliformes totais e fecais são trabalhosos, com tempo de incubação longo, de até 96 horas. Métodos rápidos para a detecção destes microrganismos têm sido desenvolvidos na área de microbiologia de alimentos. O ColiSure™ é um método rápido, que fornece resultados simultaneamente para a presença ou a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em água em 24 horas, baseando-se em reações enzimáticas específicas destes microrganismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar sua utilização para enumeração destes microrganismos em leite. Foram colhidas 95 amostras de leite pasteurizado no comércio de Londrina, Paraná, para a enumeração do Número Mais Provável (NMP), comparando o meio ColiSure™ com o Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB). A análise estatística indicou uma correlação de 0,80 entre os dois meios quando o período de incubação foi de 48 horas para coliformes totais. Devido à baixa ocorrência de *E. coli* nas amostras analisadas não foi possível comparar o desempenho dos métodos para enumeração desses microrganismos. Realizou-se então, um experimento para avaliar a sensibilidade do ColiSure™ na detecção de *E. coli*. Contra provas realizadas demonstraram maior sensibilidade e especificidade do ColiSure™ quando comparado com o CLBVB, para detecção de coliformes totais, podendo substituir o método padrão, com a vantagem de apresentar maior praticidade e rapidez na obtenção dos resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Leite; coliformes; *Escherichia coli*; ColiSure.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de um número cada vez mais significativo de surtos de toxinfecção alimentar tem alertado para a importância do controle microbiológico na indústria de alimentos. Com frequência, estas toxinfecções estão associadas ao consumo de leite ou derivados contaminados com microrganismos patogênicos ou toxinas (Vasavada, 1993).

A detecção de coliformes pode ser usada na avaliação da qualidade sanitária de alimentos e água (Matner *et al.*, 1990). Na indústria láctea é utilizada como indicativo da higiene de produção no leite cru, e da contaminação pós-pasteurização.

Para enumeração de coliformes pelos métodos tradicionais, os meios de eleição são o ágar Vermelho Violeta Bile (VRBA) utilizado no método de contagem em placas, e o Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) utilizado no método de tubos múltiplos.

Ambos os métodos são trabalhosos e o tempo de incubação é longo, chegando a 48h para coliformes totais, e 48h adicionais para a confirmação da presença de coliformes fecais (Nelson *et al.*, 1984). Métodos rápidos para a detecção destes microrganismos têm sido desenvolvidos, entre eles o Petrifilm™-PEC (Matner *et al.*, 1990), o SimPlate™CEc (Townsend *et al.*, 1998), o Colilert™, o ColiSure™ e o Readycult™.

¹ Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UEL, Londrina (PR).

² Médica Veterinária, responsável pelo Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, DMVP, CCA, UEL, Londrina (PR).

³ Médico Veterinário, Programa de Mestrado em Sanidade Animal, DMVP, CCA, UEL, Londrina (PR).

⁴ Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP).

O ColiSure™ é um sistema produzido pela IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA, que envolve substrato definido para a detecção simultânea de coliformes e *E. coli* em água, permitindo resultados em 24h. O método se baseia em enzimas constitutivas exclusivas dos coliformes e da *E. coli*. Assim, o meio oferece nutrientes indicadores específicos: o vermelho clorofenol β-D-Galactopiranosídeo (CPRG) e o 4-metil-umbeliferil β-D-glucuronídeo (MUG). Os coliformes contêm a enzima constitutiva β-Galactosidase, que metaboliza o CPRG e cliva o indicador na porção que, quando quebrada, torna-se vermelha. A *E. coli* possui a enzima β-glucuronidase, que metaboliza o MUG, liberando a porção do indicador, que quando clivada fluoresce à luz ultra-violeta. O ColiSure™ contém ainda detergentes e antibióticos que inibem o crescimento de não coliformes.

Por este sistema, o meio desidratado é adicionado a 100 mL da amostra de água e o aparecimento da coloração vermelha em 24h indica positividade para coliformes totais e a fluorescência à luz ultravioleta indica a presença de *E. coli*. O método é bastante recente no mercado, não havendo literatura sobre seu desempenho. Também não há relatos da utilização deste método para a enumeração de coliformes e *E. coli* em leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho do Colisure™ quando utilizado na técnica de tubos múltiplos para enumeração de coliformes totais e *E. coli* em leite pasteurizado, pelo método do Número Mais Provável (NMP) comparando-o com o meio padrão CLBVB.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e preparo das amostras. Foram colhidas 95 amostras de leite pasteurizado, sendo 30 do tipo A, 30 do tipo B e 35 do tipo C, em diferentes pontos de comércio da cidade de Londrina, PR e enviadas, sob temperatura de refrigeração ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina, para serem analisadas.

As amostras de leite pasteurizado foram utilizadas sem diluição e diluídas 1:10, 1:100 e 1:1000 em solução salina 0,85% e semeadas em ambos os meios em intervalos de tempo nunca superior a 5 minutos.

Metodologia padrão

Para enumeração de coliformes totais foi utilizado o CLBVB (OXOID, LTD., Basingstoke, Hampshire, England) determinando-se o NMP de coliformes totais pela técnica dos tubos múltiplos conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MARA;

Brasil, 1991-2). Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação do meio e presença de gás nos tubos de Durham após incubação a 35°C/ 24-48 horas. O NMP foi determinado correlacionando-se os tubos positivos de cada série de diluições com a tabela de NMP do MARA (Brasil, 1991-2).

Para enumeração de coliformes fecais, a partir de cada tubo positivo no CLBVB, semeou-se 30μL em tubos contendo caldo EC (Difco, Detroit, EUA) e caldo triptona (Biobrás S/A, Montes Claros, BR), incubando-os em banho maria a 44,5-45,5°C/24-48 horas, conforme descrito no MARA (Brasil, 1991-2). Consideraram-se positivas as amostras que, simultaneamente, fermentaram a lactose formando gás nos tubos de Durham e produziram indol no caldo triptona. O resultado foi obtido correlacionando-se o número de pares de tubos positivos com a tabela de NMP do MARA (Brasil, 1991-2).

ColiSure™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA). O Sistema ColiSure™, desenvolvido para indicar presença ou ausência de coliformes e *E. coli* em água, foi adaptado para a quantificação de coliformes em leite, utilizando-se a técnica de tubos múltiplos para determinação do NMP de coliformes (Brasil, 1991-2). Cada frasco de ColiSure™, contendo o meio desidratado foi dissolvido em 100 mL de água destilada esterilizada, e distribuído em tubos de ensaio previamente esterilizados (9,0 mL/tubo), procedendo-se a semeadura conforme descrito para o CLBVB. Foram considerados positivos para coliformes totais os tubos que apresentaram coloração variando do salmão ao vermelho.

A presença de *E. coli* foi detectada pela observação de fluorescência nesses tubos, quando expostos à luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm. O NMP de *E. coli* por mL de leite foi determinado utilizando-se a tabela do MARA (Brasil, 1991-2).

Experimento para avaliação da sensibilidade do ColiSure™ na detecção de *E. coli*. Para avaliar a sensibilidade do ColiSure™ na detecção de *E. coli*, foram inoculadas em leite esterilizado laboratorialmente, diluições decimais sucessivas do inóculo inicial de 3×10^8 células/mL de *E. coli* (Escala 01 de Mac Farland) até aproximadamente 03 células/mL. O controle negativo do teste foi realizado com leite esterilizado sem adição de inóculo e o controle do número de células dos inóculos foi feito por plaqueamento em Plate Count Agar (PCA).

Interpretação dos resultados. Os resultados

foram convertidos em log de base 10 e submetidos à análise de regressão linear simples e análise de variância, empregando-se os programas STATISTICA e EXCEL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na utilização dos meios ColiSure™ e CLBVB na técnica de tubos múltiplos, obteve-se uma correlação entre os resultados de 0,76 e variância de 0,14 para leitura em 24 horas e 0,80 para leitura em 48 horas e variância 0,11. As figuras 1 e 2 mostram as dispersões entre os dados e os parâmetros estatísticos obtidos no experimento. A baixa correlação encontrada pode ser atribuída ao fato de 38,1% das amostras terem apresentado contagens superiores no ColiSure™ (Tabela 1), o que tanto poderia indicar uma maior sensibilidade deste método, como a ocorrência de resultados falso-positivos.

Contra-provas foram realizadas para esclarecer os resultados selecionando-se, ao acaso, amostras em que as contagens de coliformes no ColiSure™ foram superiores às obtidas em CLBVB. Um total de 56 tubos positivos de ColiSure™ provenientes de todas as diluições destas amostras, foi semeado em CLBVB e em ágar Mac Conkey, sendo que 51 (91,1%) cresceram no ágar Mac Conkey e produziram gás no CLBVB e 05 (9,8%) não cresceram em nenhum dos meios. Os resultados confirmaram a positividade dos tubos de ColiSure™, indicando uma maior sensibilidade deste quando comparado ao CLBVB.

Das amostras em que as contagens de coliformes no ColiSure™ foram inferiores às obtidas no CLBVB (Tabela 1), selecionou-se 18 tubos negativos do ColiSure™ que foram repicados para ágar Mac Conkey e CLBVB, e em nenhum deles observou-se crescimento não ocorrendo, portanto, falso negativo no ColiSure™.

As baixas correlações encontradas nesse trabalho podem também, ter sido influenciadas por outro fator importante que foi a utilização de amostras comerciais e não de leite experimentalmente inoculado. Nessas amostras, as contagens de coliformes são baixas, o que torna a análise estatística mais rigorosa

uma vez que os intervalos de contagem são pequenos. Além disso, ao considerarmos os métodos padrões como 100% corretos, as variações são atribuídas a imprecisões inerentes aos sistemas que a eles são comparados, o que pode não representar a realidade, como constatado nesse estudo.

A coloração magenta produzida pelos tubos positivos foi facilmente visualizada, mesmo nas diluições menores. No entanto, para amostras constituídas de leite integral, variações de cor foram detectadas. Este problema foi contornado, dobrando-se a concentração do meio para amostras sem diluição, procedimento recomendado também para o CLBVB.

Devido ao grande número de amostras nas quais não se detectou a presença de coliformes fecais e *E. coli*, não foi possível comparar o desempenho do ColiSure™ para a enumeração desses microrganismos. No experimento para a avaliação da sensibilidade, observou-se que em todas as diluições e nas repetições houve detecção do microrganismo em 24 horas com produção de nítida fluorescência mesmo quando em inóculos mínimos de 3 células/mL em leite integral.

Os resultados evidenciaram que os métodos convencionais podem ser menos sensíveis e mais imprecisos que os sistemas alternativos, conforme demonstrado através das contra provas, portanto comparações superficiais entre métodos convencionais e alternativos podem incorrer em conclusões precipitadas.

CONCLUSÃO

A utilização do ColiSure™ na técnica de tubos múltiplos para enumeração de coliformes totais e *E. coli* em leite mostrou ser uma boa alternativa ao CLBVB. A sua utilização, conforme proposta neste trabalho, mostrou-se viável, apresentando vantagens como a praticidade na preparação e execução das análises, a utilização de meio de cultura único para detecção simultânea destes microrganismos em leite pasteurizado, e principalmente a rapidez na obtenção dos resultados.

ABSTRACT: In the dairy industry the coliforms detection can be used as indicative of hygiene production of the raw milk and the contamination after-pasteurization. The traditional methods for the enumeration of the total and faecal coliforms are laborious and needs an incubation time of 96 hours. Rapid methods for detection of these microorganisms have been developed and among them the ColiSure™. It is a rapid method that gives results in 24 hours and involves defined substrates for simultaneous determination of total coliforms and *E. coli* in water based in specific enzymatic reactions of these microorganisms. The objective of this study was to evaluate its utilization in milk. Ninety-five samples of pasteurized milk were collected from the markets in Londrina city, Paraná and analyzed by the Most Probable Number (NMP) enumeration using the Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBL) and ColiSure™. There was a correlation of 0.80 between the mediums when the incubation time was 48 hours for total coliforms. The low down occurrence of *E. coli* in the analyzed samples made impossible to compare the performance of methods for this microorganism. Complementary analysis showed a greater sensibility and especificity of the ColiSure™ in comparison with the BGBL. The ColiSure™ can be indicated as a substitute for the traditional method, with the advantage to be faster and easier.

KEY WORDS: milk, coliforms, *Escherichia coli*, ColiSure™.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (MARA). *Métodos de análise microbiológica para alimentos*. Brasília: [Seg. Rev.], 1991-2.
- MATNER, R.R.; FOX, T.L.; MCIVER, D.E.; CURIALE, M.S. Efficacy of Petrifilm™ *E. coli* Count Plates for *E. coli* and coliform enumeration. *Journal of Food Protection*, v.53, n.2, p.145-150, 1990.
- NELSON, C.L.; FOX, T.L.; BUSTA, F.F. Evaluation of dry medium film (Petrifilm™ VRB) for coliform enumeration. *Journal of Food Protection*, v.47, n.7, p.520-525, 1984.
- TOWNSEND, D.E; IRWING, R.L.; NAQUI, A. Comparison of the SimPlate coliform and *Escherichia coli* test with Petrifilm, three-tube MPN, and VRBA + MUG Methods for enumerating coliforms and *E. coli* in food. *Journal of Food Protection*, v.61, n. 4, p. 444 - 449, 1998.
- VASAVADA, C.P. Rapid methods and automation in dairy microbiology. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.3101-3113, 1993.