

Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

Susceptibilidade de *Staphylococcus coagulase* positiva isolados de alimentos

Ana Catarina Pires de Almeida

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Engenharia Biológica e Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professor Adjunto da Unidade Técnico-Científica da Ciência da Vida e dos Alimentos da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem a contribuição pessoal ou profissional de alguns intervenientes.

Desde já agradeço ao Eng.º Vítor Amaro Lopes, gerente da Aquimisa consultores Agro-industriais Lda. de Castelo Branco, que me acolheu nesta empresa e me proporcionou a realização deste estágio curricular, bem como aos colaboradores do laboratório, que me integraram na equipa de trabalho e se mostraram sempre disponíveis para o esclarecimento de qualquer dúvida.

À Dr.ª Cristina Maria Santos Pintado, por ter aceitado ser minha orientadora, e por se mostrar sempre disponível e interessada quando solicitada, um muito obrigado.

Aos meus pais, irmã, cunhado e namorado, por toda a paciência e incentivo que demonstraram ao longo destes anos, pois sem eles nada disto seria possível.

Agradeço a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Palavras-chave

Staphylococcus coagulase positiva, segurança alimentar, susceptibilidade, antibióticos.

Resumo

Durante o período de estágio, que decorreu entre Agosto e Novembro de 2010, foram obtidas no laboratório da Aquimisa Consultores Agro-Industriais Lda., em Castelo Branco, 42 culturas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de vários tipos de alimentos: leites de vaca, cabra e ovelha, queijo curado, salmoura, bolos (jesuíta e caramujo), saladas e cozido à Portuguesa.

Estas 42 culturas foram posteriormente, e já no Laboratório de Microbiologia da ESACB, submetidas à realização de antibiogramas, verificando-se a susceptibilidade das mesmas a 8 diferentes antibióticos: Eritromicina 15µg, Estreptomicina 10 µg, Kanamicina 30 µg, Neomicina 30 µg, Tetraciclina 30µg, Gentamicina 10µg, Cloranfenicol 30 µg e Vancomicina 30 µg. A realização dos antibiogramas permitiu-nos classificar estas culturas como sensíveis (S), intermédias (I) ou resistentes (R), a cada um dos antibióticos testados.

Com os resultados dos antibiogramas concluímos que as culturas se mostraram mais sensíveis aos seguintes antibióticos: Vancomicina 30 µg, Gentamicina 10µg, Cloranfenicol 30 µg e Kanamicina 30 µg, apresentando para todos eles uma percentagem de culturas sensíveis de 100%. Para os antibióticos Eritromicina 15µg e Tetraciclina 30µg observou-se uma maior percentagem de culturas resistentes (2.38%). Apesar de não se observarem culturas resistentes para a Estreptomicina 10 µg observou-se para este antibiótico a menor percentagem de culturas sensíveis (80.95%), devendo-se este facto à elevada percentagem de culturas com sensibilidade intermédia (19.05%).

Key-words

Coagulase-positive *Staphylococcus*, food safety, susceptibility, antibiotics.

Abstract

Between August and November 2010, forty-two cultures of coagulase-positive *Staphylococcus* were isolated from different types of food: cow milk, goat milk, sheep milk, ripened cheese, brine, cakes ("Jesuita" and "Caramujo"), salads, and "Cozido à Portuguesa". This work was done at the laboratory of Aquimisa Consultores Agro-Industriais Lda., Castelo Branco.

Posteriorly, at the Microbiology Laboratory of ESACB, these forty-two cultures were evaluated for their susceptibility to eight different antibiotics: Erythromycin 15 µg, Kanamycin 30 µg, Streptomycin 10 µg, Neomycin 30 µg, Tetracycline 30 µg, Gentamicin 10 µg, Chloramphenicol 30 µg and Vancomycin 30 µg. The realization of the antibiograms allowed us to classify these cultures as sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R) to each antibiotic tested.

With the results of antibiograms we can conclude that cultures were more sensitive to the following antibiotics: Vancomycin 30 µg, Gentamicin 10 µg, Chloramphenicol 30 µg and Kanamycin 30 µg, with 100% of sensitive cultures. For the antibiotics Erythromycin 15µg and Tetracycline 30µg there was a higher percentage of resistant cultures (2.38%). Although was not observed cultures resistant to Streptomycin 10 µg, was observed for this antibiotic the lower percentage of sensitive cultures (80.95%) and 19.05% of cultures with intermediate susceptibility.

Índice Geral

| | |
|--|----|
| I. Introdução | 1 |
| II. Revisão bibliográfica | 3 |
| 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 |
| 2.1.1. Morfologia | 3 |
| 2.1.2. Crescimento | 3 |
| 2.1.3. Estrutura | 4 |
| 2.2. Intoxicação alimentar Estafilocócica | 4 |
| 2.3. Resistência dos <i>Staphylococcus aureus</i> aos antibióticos | 6 |
| 2.3.1. Desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos | 7 |
| 2.4. Susceptibilidade antimicrobiana | 7 |
| 2.4.1. Método de diluição | 8 |
| 2.4.2. Método por difusão | 9 |
| • Meio de cultura | 9 |
| • Densidade do inóculo | 10 |
| • Concentração do antibiótico | 10 |
| 2.4.3. E-test | 11 |
| 2.5. Características dos antibióticos usados neste trabalho | 11 |
| III. Trabalho desenvolvido na Aquimisa | 13 |
| 3.1. Rotina Laboratorial | 13 |
| 3.1.1. Recepção de amostras | 13 |
| 3.1.2. Preparação dos meios de cultura | 14 |
| 3.1.3. Preparação do material | 14 |
| 3.1.4. Análises microbiológicas | 14 |
| 3.2. Culturas de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> obtidos de alimentos na Aquimisa | 15 |
| 3.3. Contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> | 16 |
| IV. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da ESACB | 19 |
| 4.1. Método Kirby-Bauer | 20 |
| 4.1.1. Obtenção de culturas jovens de <i>Staphylococcus</i> | 21 |
| 4.1.2. Preparação do inóculo | 21 |
| 4.1.3. Inoculação em placas | 22 |
| 4.1.4. Aplicação dos discos de antibióticos | 22 |
| 4.1.5. Incubação das placas | 23 |
| 4.1.6. Leitura dos resultados | 23 |
| V. Resultados e discussão | 25 |
| VI. Conclusão | 31 |
| VII. Bibliografia | 33 |
| Anexos | |

| | |
|---------|----|
| Anexo 1 | 37 |
| Anexo2 | 41 |
| Anexo3 | 47 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura1- <i>Staphylococcus aureus</i> ao microscópio electrónico de varrimento | 3 |
| Figura2- Método de diluição - determinação da MIC e MBC | 8 |
| Figura3- Colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> em BP+RPF | 16 |
| Figura4- Sequência de passos a seguir na contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva | 17 |
| Figura5- Metodologia seguida no método de Kirby-Bauer | 20 |
| Figura6- Inoculo já preparado | 21 |
| Figura7- Inoculação das placas de forma a obter-se um crescimento confluyente | 22 |
| Figura8- Colocação dos discos a superfície do meio e pressão exercida em cada um deles | 23 |
| Figura 9- Resultados obtidos para as 42 culturas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, testados para 8 antibióticos cada, num total de 336 ensaios | 26 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Alimentos associados a intoxicação alimentar por <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes países | 5 |
| Tabela 2- Características dos antibióticos usados neste trabalho | 11 |
| Tabela 3- Microrganismos analisados durante o período de estágio | 14 |
| Tabela 4- Culturas de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva e amostras a partir dos quais foram isolados | 15 |
| Tabela 5- Classificação em função dos diâmetros das zonas de inibição | 24 |
| Tabela 6- Análise geral do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 42 culturas de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva avaliadas neste trabalho | 25 |
| Tabela 7- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 17 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de leite | 27 |
| Tabela 8- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 3 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de bolo | 27 |
| Tabela 9- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 6 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de saladas | 28 |
| Tabela 10- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 6 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de cozido a portuguesa | 28 |
| Tabela 11- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 4 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de salmoura | 29 |
| Tabela 12- Resultados obtidos em mm para os ensaios de susceptibilidade a 8 antibióticos relativamente a 6 isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva de amostras de queijo curado | 29 |

Lista de abreviaturas

- APT- Água Peptonada Tamponada
ASAE- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
C- Cloranfenicol
E- Eritromicina
ES- Estreptomicina
GM- Gentamicina
HACCP- Hazard Analysis and Critical Control Points
K- Kanamicina
MBC- Minimum Bactericidal Concentration
MIC- Minimum Inhibitory Concentration
NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards
N- Neomicina
PCA- *Plate Count Agar*
RVS- *Rapaport Vassiliadis Soja*
TBX- *Tryptone Bile Glucoronic Medium*
TE- Tetraciclina
TSA- Teste de sensibilidade a antimicrobianos
V- Vancomicina
XLD- *Xylose Lysine Deoxycholate*