



ARTIGO ORIGINAL

Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado

Alternative test for detection of coliforms in manually expressed human milk

Franz R. Novak¹, João Aprígio Guerra de Almeida²

Resumo

Objetivo: comparar um método alternativo com o teste do número mais provável (NMP) para detecção de coliformes totais em leite humano ordenhado.

Métodos: 343 amostras de leite humano ordenhado, obtidas a partir de frascos oriundos de coleta domiciliar, recebidas pelo Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira – IFF, por doadoras previamente orientadas, foram encaminhadas ao laboratório de controle de alimentos do IFF e empregadas na comparação de dois métodos: 1 - técnica do número mais provável, conforme descrito no *Standard methods for the examination of dairy products*; 2 - método alternativo proposto.

Resultados: os microorganismos do grupo coliformes foram detectados em 31,2% das amostras analisadas, com populações variando de $3,0 \times 10^0$ a $1,1 \times 10^4$ coliformes totais N.M.P/ml. A comparação do teste clássico com o alternativo revelou resultados semelhantes quanto à recuperação de microorganismos coliformes em amostras de leite humano ordenhado. O método alternativo detectou a presença de coliformes totais em todas as amostras contaminadas e em quatro amostras não contaminadas, segundo o teste de NMP.

Conclusão: o teste alternativo permite constatar a presença ou ausência de coliformes, tornando-se útil no controle de qualidade dos frascos de leite humano ordenhado pasteurizados, manipulados nos bancos de leite humano. Portanto, o teste de NMP pode ser substituído pelo teste alternativo que poderá ser empregado como rotina nos bancos de leite humano, já que seu custo equivale a 1/7 do tradicional.

J Pediatr (Rio J) 2002; 78 (3):193-6: banco de leite humano, leite humano ordenhado, coliformes, controle de qualidade.

Abstract

Objective: to compare an alternative method to the most probable number (MPN) test for the detection of total coliform present in manually expressed human milk.

Methods: 343 samples of manually expressed human milk from flasks donated to the Human Milk Bank of Instituto Fernandes Figueira - IFF were sent to the Laboratory of Food Control of IFF. The samples were used for comparing both methods, i.e., the most probable number (MPN) method, as described in the “Standard methods for the examination of dairy products”, and the alternative method.

Results: coliforms were detected in 31.2% of the samples analyzed, with populations ranging from 3.0×10^0 to 1.1×10^4 total coliform MPN/mL. The comparison between classical and alternative methods showed similar results regarding the presence of coliform microorganisms in expressed human milk samples. The alternative method detected the presence of total coliform in all contaminated and in four noncontaminated samples according to the MNP method.

Conclusions: the alternative test allows the detection of the presence or absence of coliforms and it is useful for the quality control of pasteurized flasks containing manually expressed human milk manipulated at human milk banks. Therefore, we conclude that the alternative test can be used in the routine of human milk banks as a substitute for the MNP method, since its cost is equivalent to 1/7 of the cost of the traditional method.

J Pediatr (Rio J) 2002; 78 (3):193-6: human milk bank, human milk, coliform, quality control.

1. Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor nos Cursos de Mestrado e Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança do Instituto Fernandes Figueira - IFF / Fundação Oswaldo Cruz. Membro da equipe do Banco de Leite Humano do IFF.
2. Doutor em Saúde Pública pelo Instituto Fernandes Figueira – IFF/ Fundação Oswaldo Cruz. Professor nos Cursos de Mestrado e Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança do Instituto Fernandes Figueira. Chefe do Banco de Leite Humano do IFF.

Artigo submetido em 26.03.01, aceito em 27.03.02.

Introdução

A relação de causa e efeito no processo de transmissão de doenças relacionadas especificamente com alimentos contaminados com material de origem fecal foi, inicialmente, defendida por Von Frisch em 1880, quando identificou *Klebsiella sp* em fezes humanas. Posteriormente, a relação entre os microorganismos provenientes desse material e

doenças do trato gastrointestinal foi estabelecida por Escherich, que descreveu o *Bacillus coli*, atualmente *Escherichia coli*, sugerindo que tal microorganismo pudesse ser utilizado como indicador de contaminação de origem fecal¹.

Posteriormente, pesquisadores descobriram que diferentes patógenos ocorriam descontinuamente e em concentrações variáveis nas fezes, mas, apesar disso, acreditavam que deveria existir um indicador capaz de revelar a presença desses agentes a partir destes materiais².

Em 1892, Sharding sugeriu que os coliformes poderiam ser usados como indicadores de contaminação fecal, face a possibilidade de serem recuperados mais facilmente do que outras espécies entéricas, a exemplo da *Salmonella*³.

Por definição, o grupo de coliformes totais inclui bactérias gram-negativas não esporuladas, fermentadoras de lactose, com produção de ácido e gás em faixa de temperatura que varia entre 32 e 37°C⁴⁻⁶. Por sua vez, coliformes fecais constituem um subgrupo dos coliformes totais, cujo habitat natural é o trato intestinal dos animais homeotérmicos e que, do ponto de vista sanitário, funcionam como indicadores capazes de evidenciar uma maior probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal, caracterizados ainda pela sua capacidade de fermentarem a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5°C^{6,7}.

Do ponto de vista de constituição, o grupo dos coliformes é composto por bactérias de um número restrito de gêneros e inclui basicamente *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Erwinia* e *Enterobacter*⁸.

Os coliformes fecais, por se tratarem de um subgrupo, cuja detecção é seqüencial e dependente dos resultados positivos para coliformes totais, indicam com maior grau de certeza a possível presença de patógenos entéricos. Dentre os microorganismos isolados, a partir dos testes de coliformes fecais, a *E. coli* é encontrada com maior frequência^{5-7,9}, transformando-se, assim, no indicador clássico para a possível presença de patógenos entéricos em alimentos¹⁰, em particular, no leite humano ordenhado¹¹.

Quando se pensa na definição de indicadores microbiológicos para controle de qualidade de alimentos, há que se considerar que um indicador sanitário ideal deveria ser de cultivo simples, econômico e incapaz de apresentar resultados falsos. Além disso, a técnica de análise para sua detecção deve ser facilmente exequível e de boa reprodutibilidade. Diante dessas exigências, o método mais indicado na literatura é o do número mais provável (NMP) de coliformes¹¹⁻¹³.

Em resumo, a ocorrência de coliformes totais indica claramente a inobservância das boas práticas de manipulação e constitui um alerta para a possível presença de outros microorganismos de maior patogenicidade e mais difíceis de serem detectados, configurando uma situação desfavorável para a saúde dos receptores do alimento. Já os coliformes fecais indicam com maior grau de certeza a presença de

outros microorganismos que acompanham a *E. coli* na ecologia fecal¹⁴.

Com o objetivo de compatibilizar as variáveis custo e segurança operacional, o presente estudo foi conduzido no intuito de comparar a metodologia clássica para detecção de coliformes totais¹⁵ com um método alternativo.

Métodos

Obtenção das amostras de leite humano ordenhado

As doadoras de leite humano ordenhado (LHO) do Banco de Leite Humano do Instituto Fernandes Figueira (BLH-IFF) foram orientadas a realizarem a coleta domiciliar após a lavagem das mãos com água e sabão, escovação das unhas e lavagem das mamas com água potável. Após, realizaram a coleta por expressão manual, podendo ainda empregar bombas ordenhadeiras previamente esterilizadas.

A seguir, colocaram o leite diretamente em frascos esterilizados, que foram fornecidos pelo BLH/IFF e em seguida armazenados sob congelamento até o momento em que foram transportados, nas mesmas condições, para o BLH, onde foram descongelados, utilizando-se um banho-maria a 40°C, antes de serem pasteurizados.

No presente estudo, foram obtidas 343 amostras de leite humano ordenhado a partir de frascos de LHO doados, coletadas nas condições descritas anteriormente e encaminhadas ao laboratório de controle de alimentos do Instituto Fernandes Figueira, as quais foram empregadas na comparação dos dois métodos, descritos a seguir.

1 - Determinação de coliformes totais pelo método clássico: foram realizadas, pela técnica do número mais provável, de acordo com o descrito no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*¹⁶, promovendo-se uma agitação de pelo menos 20 segundos, empregando-se um agitador tipo *vórtex*, antes da retirada das alíquotas a serem testadas.

2 - Determinação da presença de coliformes pelo método alternativo: foi levada a termo a partir da inoculação de quatro alíquotas de LHO, de um mililitro cada, pipetadas independentemente, após agitação por 20 segundos, e colocadas em um tubo de ensaio contendo 10ml de caldo bile verde brilhante lactose 2% (Merck), preparadas na concentração de 50g de meio de cultura para cada litro de água recém-destilada e distribuídas em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Após a inoculação, os tubos foram incubados a 36° ± 1°C por 24-48 horas e observada a presença ou ausência da formação de gás nos tubos de Durhan, teste Presuntivo.

A partir dos tubos positivos, semeou-se, com auxílio de uma alça bacteriológica calibrada a 1/100, em novos tubos de caldo bile verde brilhante, preparados conforme as recomendações do fabricante (40g/litro de água recém

destilada) e incubou-se a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas, observando-se a presença ou ausência de coliformes através da formação de gás nos tubos de Durham, teste Confirmatório.

Apesar do teste proposto se destinar à pesquisa de coliformes em leite humano ordenhado pasteurizado, no presente experimento, não foram utilizadas amostras de LHO pasteurizado, devido à ocorrência extremamente pequena de coliformes em tal produto, o que dificultaria a comparação entre os dois testes e a eficiência do teste alternativo.

Análise dos dados: foi realizada através dos Softwares Epi-Info 5.1¹⁷ e SPSS for Windows¹⁸.

Resultados

Os microorganismos do grupo coliformes foram detectados em 30% das amostras analisadas, com populações variando de $3,0 \times 10^0$ a $1,1 \times 10^4$ coliformes totais NMP/ml (Tabela 1). O teste alternativo detectou a presença de coliformes totais em todas as amostras contaminadas, e em uma não contaminada, de acordo com o teste de NMP (Tabela 2)

Discussão

A prática tem mostrado que não podemos aplicar nenhum plano de amostragem para análise microbiológica de LHO pasteurizado, uma vez que cada frasco que chega ao banco de leite foi obtido de uma doadora em uma condição higiênico-sanitária que pode variar de uma coleta para outra, tornando a flora de contaminação secundária bastante diversificada entre os frascos doados pela mesma doadora.

Como o LHO não é misturado, não se pode utilizar o conceito de lote, como se faz na indústria de alimentos. Desta forma, torna-se obrigatória a análise de todos os frascos de LHO após sua pasteurização, o que implica em uma quantidade muito grande de amostras a serem analisadas e, por conseguinte, demandam grandes quantidades de meios de cultura e de mão-de-obra.

Tabela 1 - Distribuição de coliformes totais em 343 amostras de leite humano ordenhado, analisadas pela técnica de número mais provável

Faixa de contagem (NMP/ml)	Número de amostras	%
< 1 (ausência)	240	70,0
1 —10	16	4,7
10 —100	09	2,6
100 —1000	11	3,2
> 1.000	67	19,5
Total	343	100

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir da comparação de dois testes para pesquisa de coliformes totais aplicados a 343 amostras de leite humano ordenhado

Resultado do teste alternativo	Resultado do teste		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo*	103	04	107
Negativo	00	236	236
Total	103	240	343

* A diferença observada nos resultados positivos poderia ser explicada devido à perda de 0,67 ml durante o processo de diluições sucessivas no teste clássico.

Além disso, torna-se impossível examinar todas as amostras de LHO pasteurizadas a procura de uma grande variedade de microorganismos patogênicos, devido aos custos de tais operações. Principalmente, quando se pensa que os bancos de leite humano funcionam como unidades que não compram nem vendem leite humano e, por isso, têm que adequar suas atividades a custos mínimos e ao menor intervalo de tempo de resposta, devido à velocidade de reciclagem de seus estoques de LHO. Por isso, torna-se oportuna a realização do teste de coliformes nos produtos pasteurizados a serem distribuídos.

Existe, ainda, a necessidade de se buscar novos métodos que permitam realizar grandes números de análises e que propiciem a mesma segurança dos testes tradicionais a custos cada vez mais reduzidos.

Após as inoculações, as concentrações finais do meio de cultura nos dois métodos eram praticamente as mesmas, sendo que as diferenças básicas ficaram por conta das quantidades e das formas de inoculação das amostras estudadas. A maior recuperação de coliformes pelo método alternativo pode ser imputada à maior quantidade de amostra inoculada, uma vez que, ao utilizar 4 ml de amostra, estaria-se adicionando 0,67 ml a mais de amostra do que no teste clássico, com três séries e três diluições, no qual são utilizados 3,33 ml de amostra de LHO. A diferença a favor do teste alternativo poderia ser explicada pela perda de 0,67 (4-3,33) ml durante o processo de diluições sucessivas.

Todos os testes que apresentavam resultados positivos foram submetidos ao teste confirmatório, e os crescimentos observados, cultivados em ágar Mac Conkey e classificados por técnicas tradicionais de microbiologia, que confirmaram a presença de coliformes nas 4 amostras, que apresentaram resultados positivos no teste alternativo e negativo do teste de NMP. Essa diferença de resultados entre os dois testes podem ser explicadas pela distribuição irregular dos microorganismos nos meios líquidos e/ou pela maior quantidade de produto analisada no teste alternativo.

O teste proposto não quantifica a população de coliformes, fornecendo apenas resultados expressos em termos de presença e ausência, que significa, respectivamente, resultados positivos ou negativos. Com isso, ao se determinar

coliformes nas amostras analisadas de LHO pasteurizado por esse método, perde-se a oportunidade de conhecer o número mais provável desses microorganismo no produto. No entanto, para o propósito básico dessa análise nos bancos de leite humano, o simples fato da presença de coliformes, sejam eles quais forem e em que quantidade estiverem, já estaria absolutamente fora de propósito, tornando o produto impróprio para o consumo por bebês prematuros.

A detecção de microorganismos coliformes em produtos pasteurizados constitui uma indicação da existência, em algum ponto no caminho percorrido pelo LHO, de quebra das boas práticas de procedimento, o que equivale dizer que as informações fornecidas pelo laboratório somente podem ser usadas para apontar as causas da anormalidade, quando se conhece um histórico adequado do produto em questão¹⁶.

A recontaminação dos produtos processados através do manuseio ou falhas na pasteurização é exemplo de condições que podem ser encontradas e corrigidas em qualquer estabelecimento que manipule LHO pasteurizado, em função dos resultados da colimetria¹⁹.

Além disso, o aspecto mais relevante deste estudo se reporta à economia proporcionada pelo método alternativo, que pode ser evidenciada a partir de vários aspectos. No que tange ao fator insumo, há de se considerar que o método clássico demanda, no mínimo, o emprego de três séries e três diluições, totalizando um consumo de 3,6g de meio de cultura. No método alternativo, gasta-se apenas um único tubo de ensaio, contendo 0,5g do meio de cultura por amostra analisada, resultando na redução da mão-de-obra e de materiais, como pipetas e tubos de ensaios, entre outros.

A comparação do teste clássico com o proposto revelou resultados bastante semelhantes no que tange à recuperação dos microorganismos coliformes a partir das amostras de leite humano ordenhado. Tais resultados são importantes, pois comprovam a eficiência e a segurança do teste alternativo.

Como o teste alternativo permite constatar a presença ou ausência de coliformes, com elevado grau de confiabilidade, poderá ser empregado no controle de qualidade dos frascos de leite humano ordenhado pasteurizados manipulados nos bancos de leite humano, principalmente por apresentar custo equivalente a 1/7 do valor do tradicional.

Referências bibliográficas

- Guarriaia LJ. Brief literature review of *Klebsiella* as pathogens. In: Seminar on the significance of fecal coliforms in industrial waste. E.P.A.T.R. 3. National Field Investigations Center, Denver, Colorado; USA; 1972.
- Wolf HW. The coliform count as a measure of water quality. In: Mitchell R, ed. Water pollution microbiology. New York: Interscience; 1972.p.333-5.
- APHA - American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Speck ML, ed. 2ª ed. Washington D.C., USA; 1984.

- Senyk GF, Kozlowski SM, Noar PS, Shipe WF, Bandler DK. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. J Dairy Sci 1987; 70:1152-8.
- Boor KJ, Brown DP, Murphy SC, Kozlowski SM, Bandler DK. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. J Dairy Sci 1998; 81:1743-8.
- Townsend DE, Irving RL, 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. J Food Prot 1998; 61:444-9.
- Jordano R, Lopez C, Rodriguez V, Cordoba G, Medina LM, Barrios J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. Acta Microbiol Immunol Hung 1995; 42:255-9.
- Geldreich EE. Sanitary significance of fecal coliforms in the environment water pollution control research series, publication wp-20-3. Federal Water Pollution Control Administration, U.S. Department of the Interior, Cincinnati, Ohio; 1966.
- Grabow WOK. Evaluation of standard and modified M-Fc, Mac Conkey and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water. Appl Environ Microbiol 1981; 42: 192-9.
- Lamka KG, Le Chevallier MW, Seidler RJ. Bacterial contamination of drinking water supplies in a modern rural neighborhood. Appl Environ Microbiol 1980; 39:734-8.
- Almeida JAG, Novak FR, Almeida CHG, Serva VB. Avaliação da flora microbiana do leite humano ordenhado no IMIP. Rev do IMIP 1998; 3:13-6.
- Gesche E, Schoebitz R. Evaluacion de diversos metodos de deteccion de coliformes en alimentos. Acta Cient Venez 1982; 33:158-60.
- Baruffaldi R, Penna TCV, Machoshvili IA, Abe LE. Condições higiênicas-sanitárias do leite pasteurizado tipo "B" vendido na cidade de São Paulo, SP (Brasil), no período de fevereiro a agosto de 1982. Rev Saúde Pública 1984; 18:367-74.
- Oliveira CPS, Cabral TMA, Lima AWO. Coliformes totais e fecais e caracterização dos coliformes fecais em queijo tipo coalho comercializado em João Pessoa - PB. Ciencia, Cultura e Saude 1984;6:34-8.
- ICMSF - International Commission of Microbiological Specification for Foods. Their significance and methods of enumeration. 2ª ed. Toronto: University of Toronto Press; 1975.
- Hausler WJ. Standard methods for the examination of dairy products. 13ª ed. Washington, D.C.: American Health Association; 1977.
- Dean AG, Dean JA, Burton AH, Dicker RC. Epi-Info. Version 5. A word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta: Center for Disease Control; 1990.
- SPSS Realease 6.0. Chicago: SPSS Inc.; 1993.
- Almeida JAG, Novak FR, Almeida CHG, Chave RMM, Araujo FMS, Garrido JRP. Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano. Ministério da Saúde. 2ª edição revisada. Brasília; 1998.

Endereço para correspondência:

Dr. Franz Reis Novak

Banco de Leite Humano - Instituto Fernandes Figueira

Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo

CEP 22250-020 - Rio de Janeiro, RJ

Fone/fax: (21) 2553.5669

E-mail: novak@iff.fiocruz.br