

VPS 5710

Introdução à análise microbiológica de alimentos

Fundamentos de análises microbiológicas dos alimentos

Evelise Oliveira Telles - bufalo@usp.br

INTRODUÇÃO

- ▶ análises laboratoriais
- ▶ microrganismos indicadores
- ▶ microrganismos patogênicos



Análises Laboratoriais

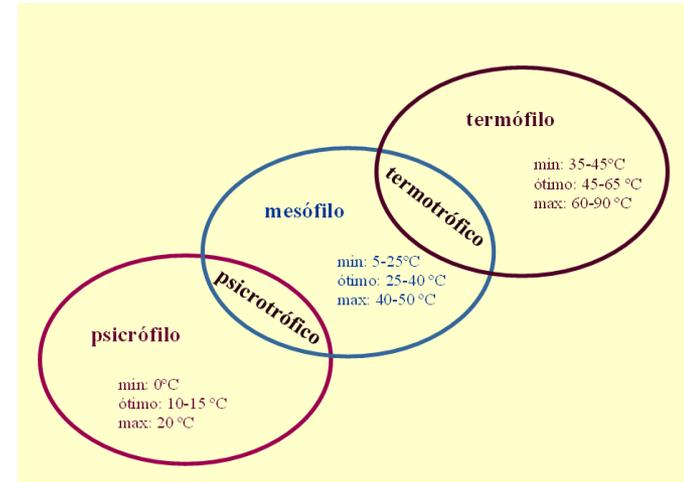
- ▶ métodos convencionais
 - cultivo
- ▶ amostragem
 - planos de amostragem de acordo com a natureza da preocupação e a modulação do perigo
- ▶ legislação e interpretação de resultados
 - MAPA e MS



Microrganismos indicadores

➤ Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis

- mesófilos (Contagem Padrão em Placas)
- psicrotróficos
- termófilos



➤ Microrganismos Anaeróbios

➤ Bolores e Leveduras

➤ Coliformes Totais (família: *Enterobacteriaceae*; gêneros *Escherichia*, *Klebsiela*, *Enterobacter*, *Citrobacter*)

➤ Coliformes Fecais (*E. coli* e algumas cepas dos outros gêneros)

➤ *Staphylococcus* coagulase positivo

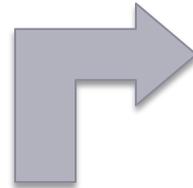


Bactérias Patogênicas

- ▶ *Salmonella* spp.
- ▶ *Listeria monocytogenes*



análises



diluição



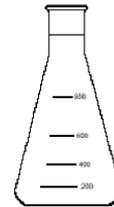
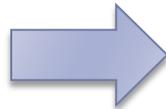
contagem padrão

bolores e leveduras

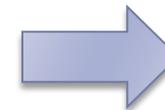
coliformes

Staphylococcus

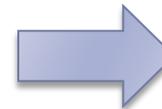
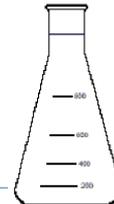
amostra



enriquecimento

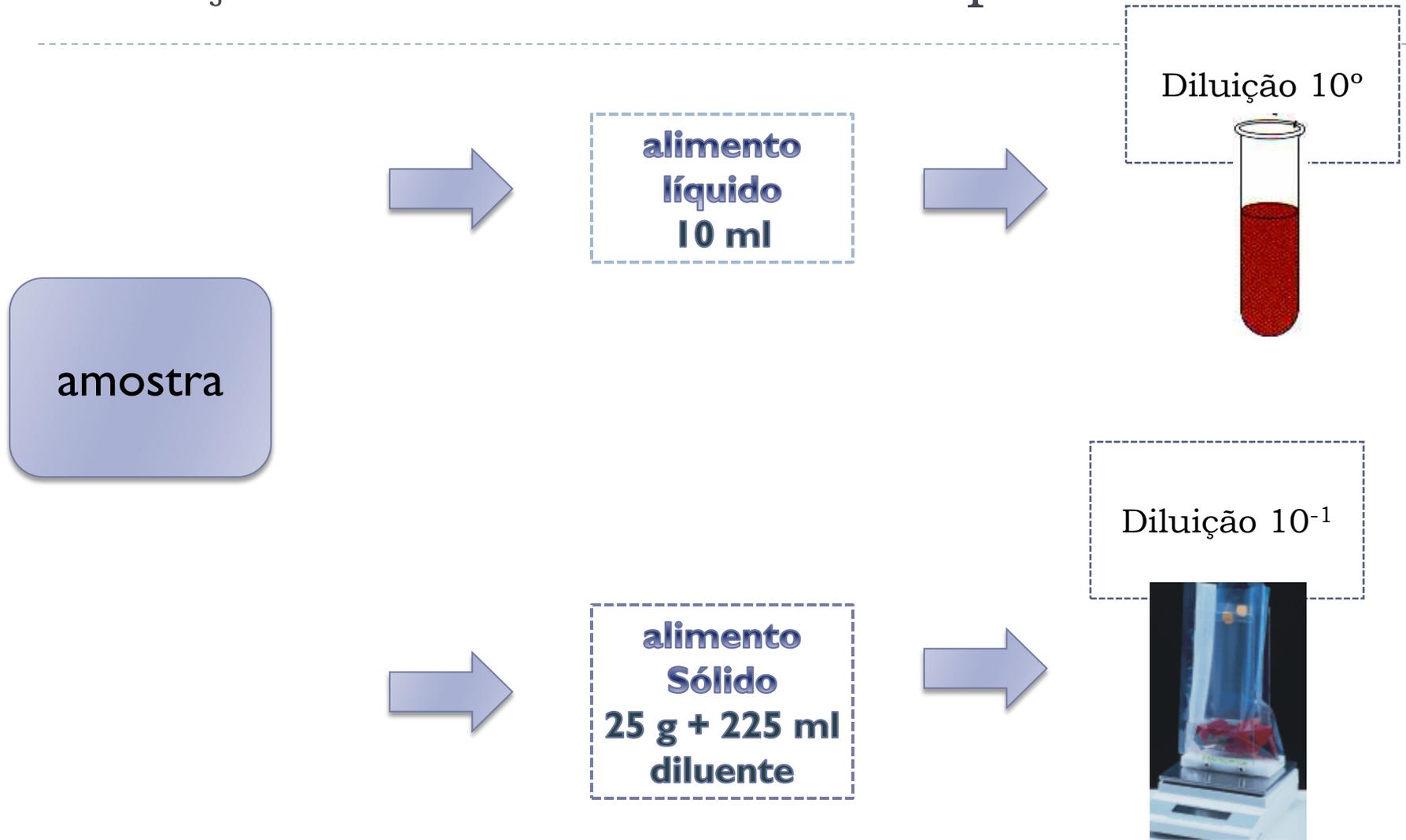


Salmonella spp.



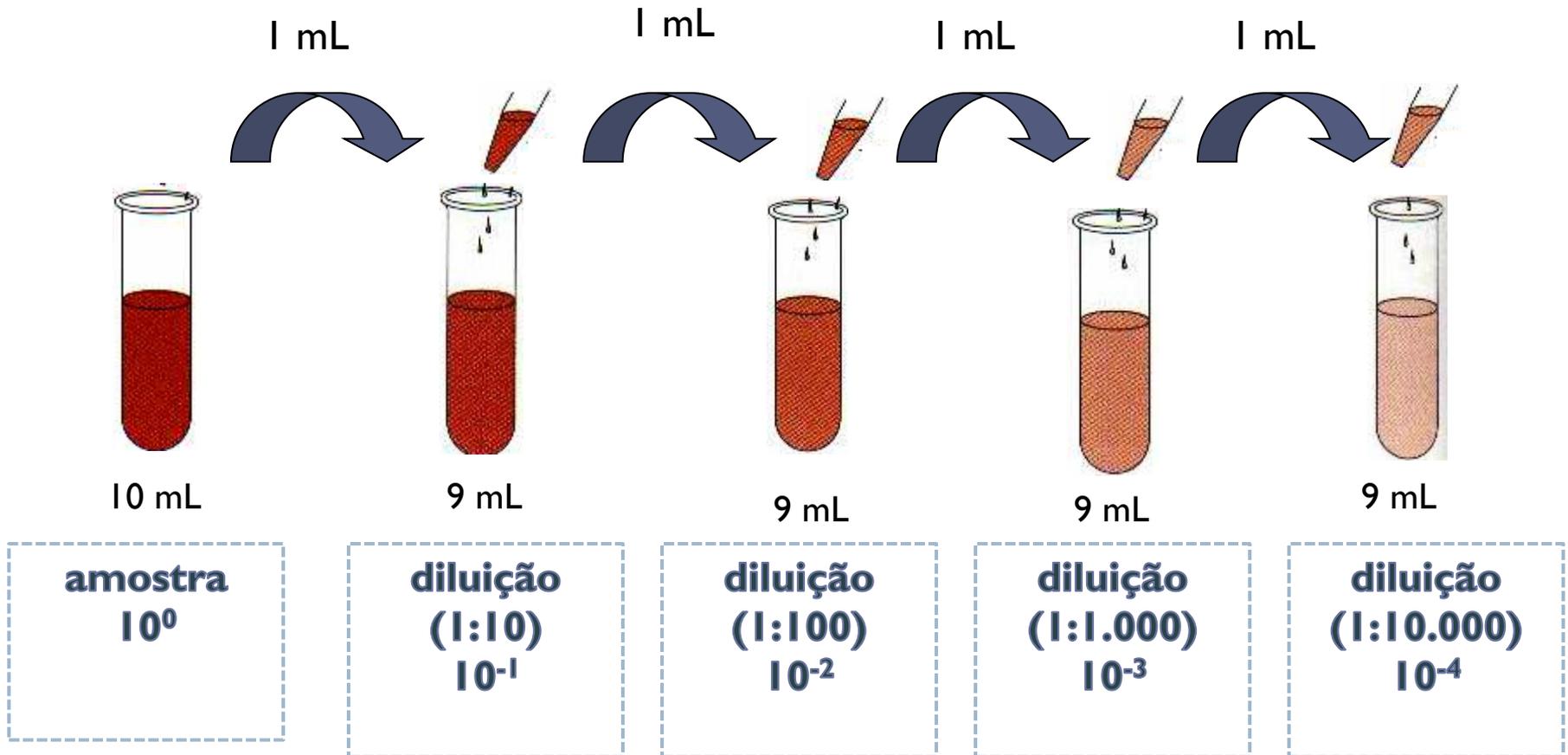
Listeria monocytogenes

Diluição: alimentos sólido X líquido



TÉCNICA DE DILUIÇÃO SERIADA

amostras líquidas

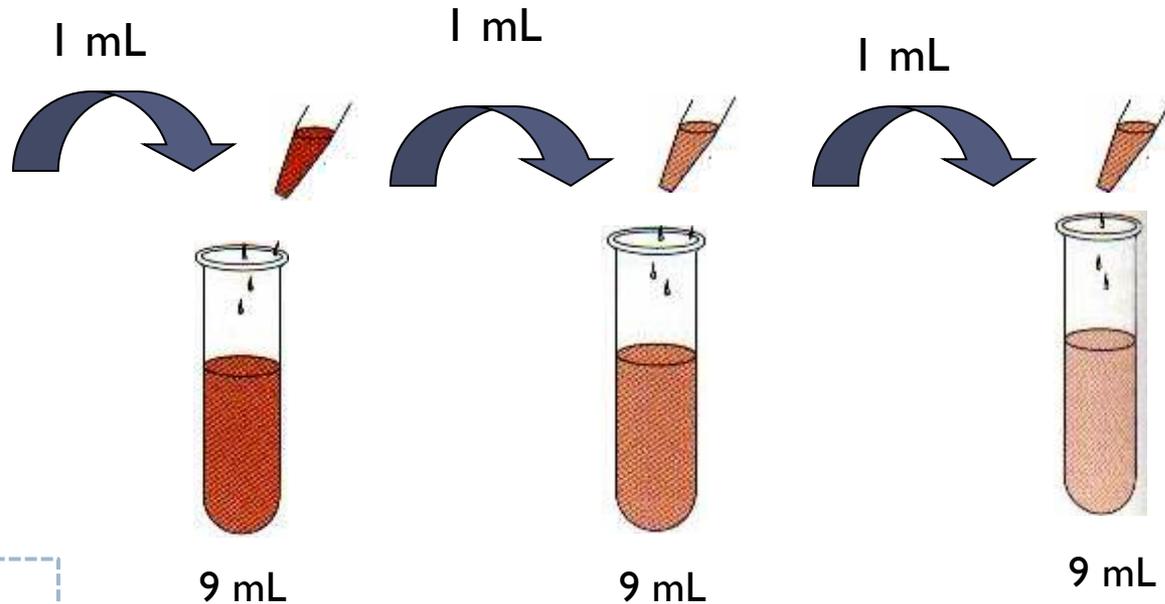


TÉCNICA DE DILUIÇÃO SERIADA

amostras sólidas



amostra
25g +225mL
água
peptonada
diluição
(1:10)
 10^{-1}
homogeneização

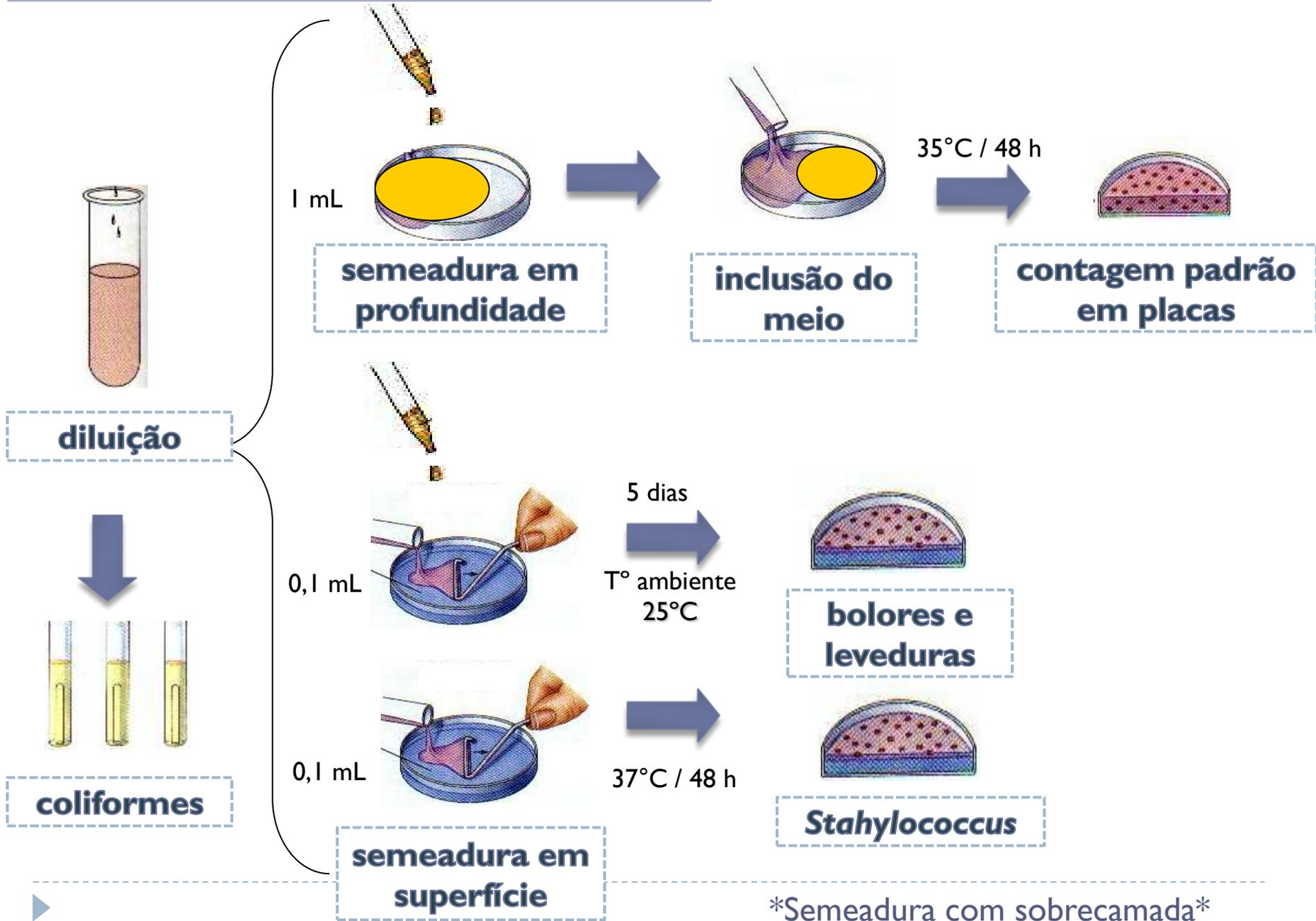


diluição
(1:100)
 10^{-2}

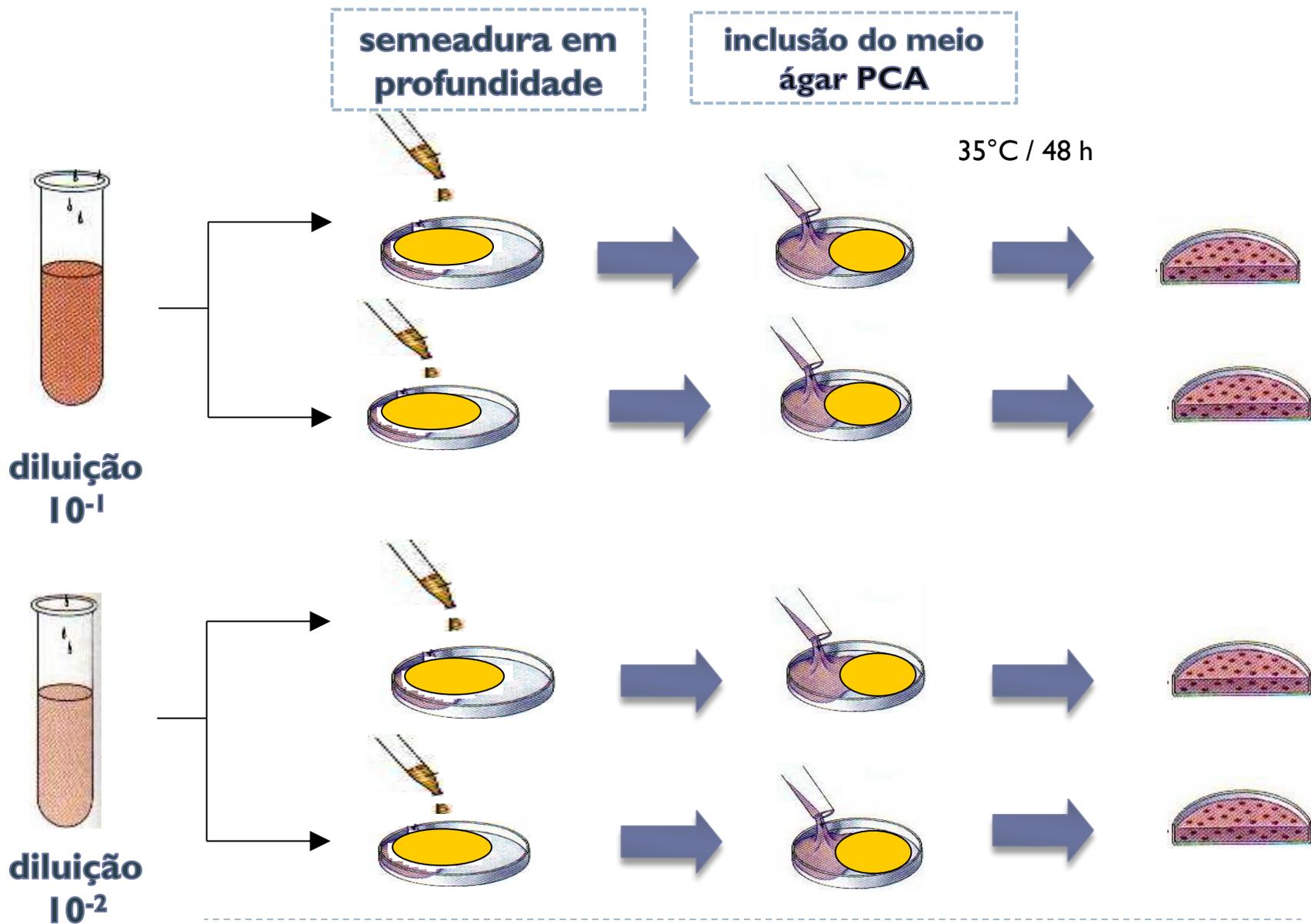
diluição
(1:1.000)
 10^{-3}

diluição
(1:10.000)
 10^{-4}

Tipos de sementeira com volume conhecido



CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS



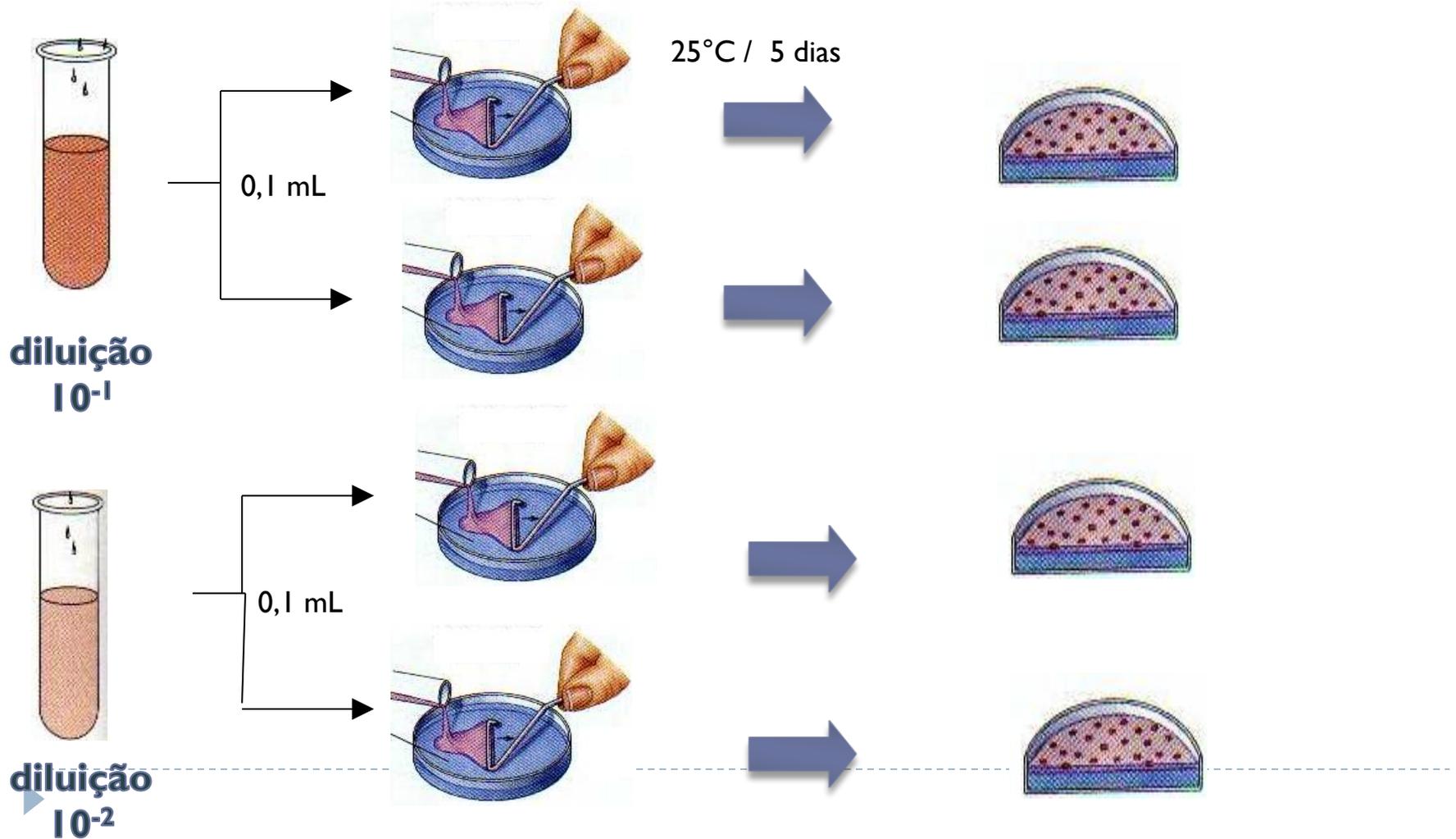
RESULTADOS: CONTAGEM PADRÃO

- ▶ eleger a melhor diluição que se encontra dentro do parâmetro (25 - 250)
- ▶ contar as colônias em cada placa
- ▶ fazer a média aritmética das placas
- ▶ multiplicar pelo inverso da diluição
- ▶ resultado em UFC/g ou mL (1 dígito antes e 1 dígito depois da vírgula)



CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS

semeadura em superfície
ágar batata acidificado

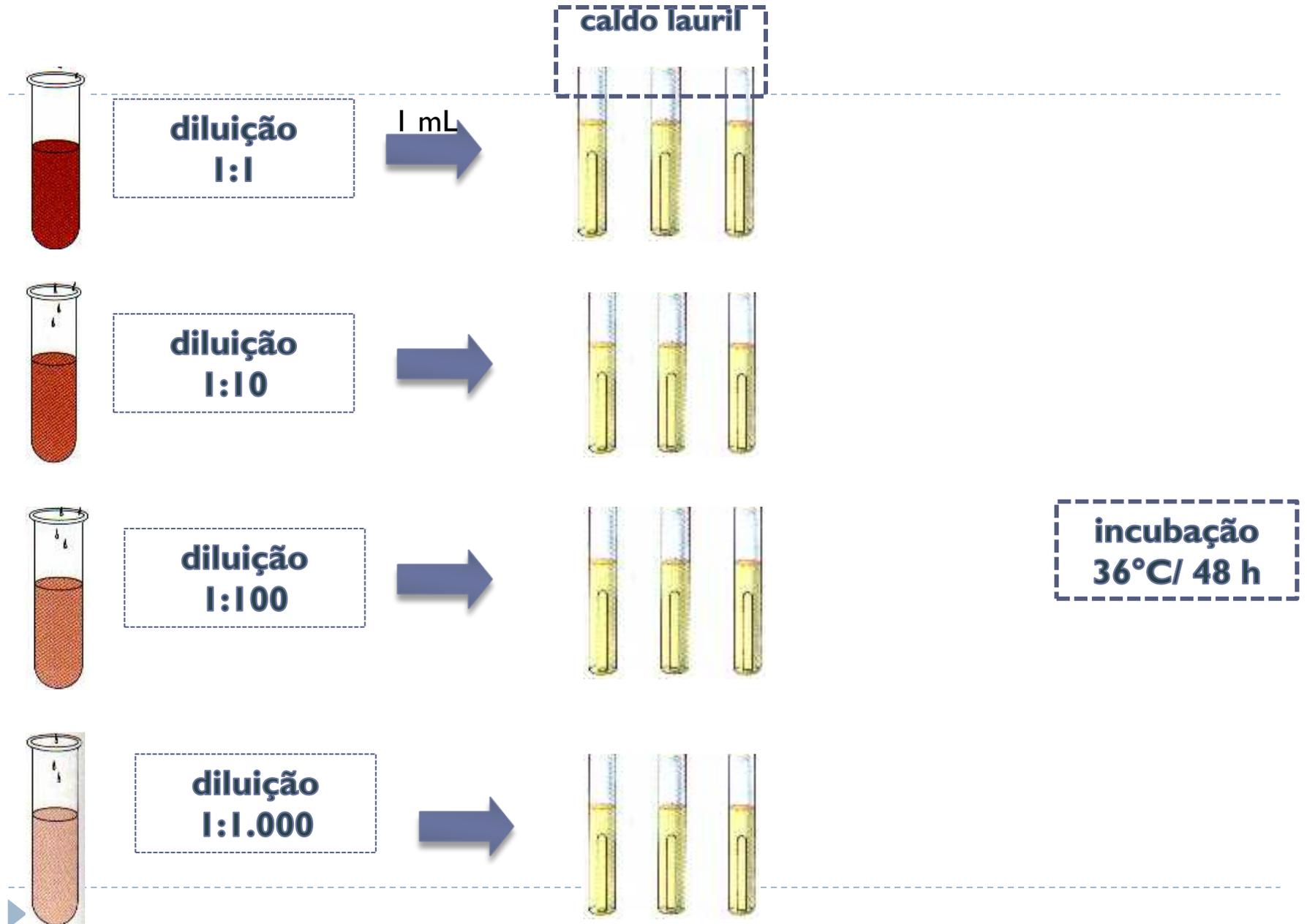


RESULTADOS: BOLOR E LEVEDURA

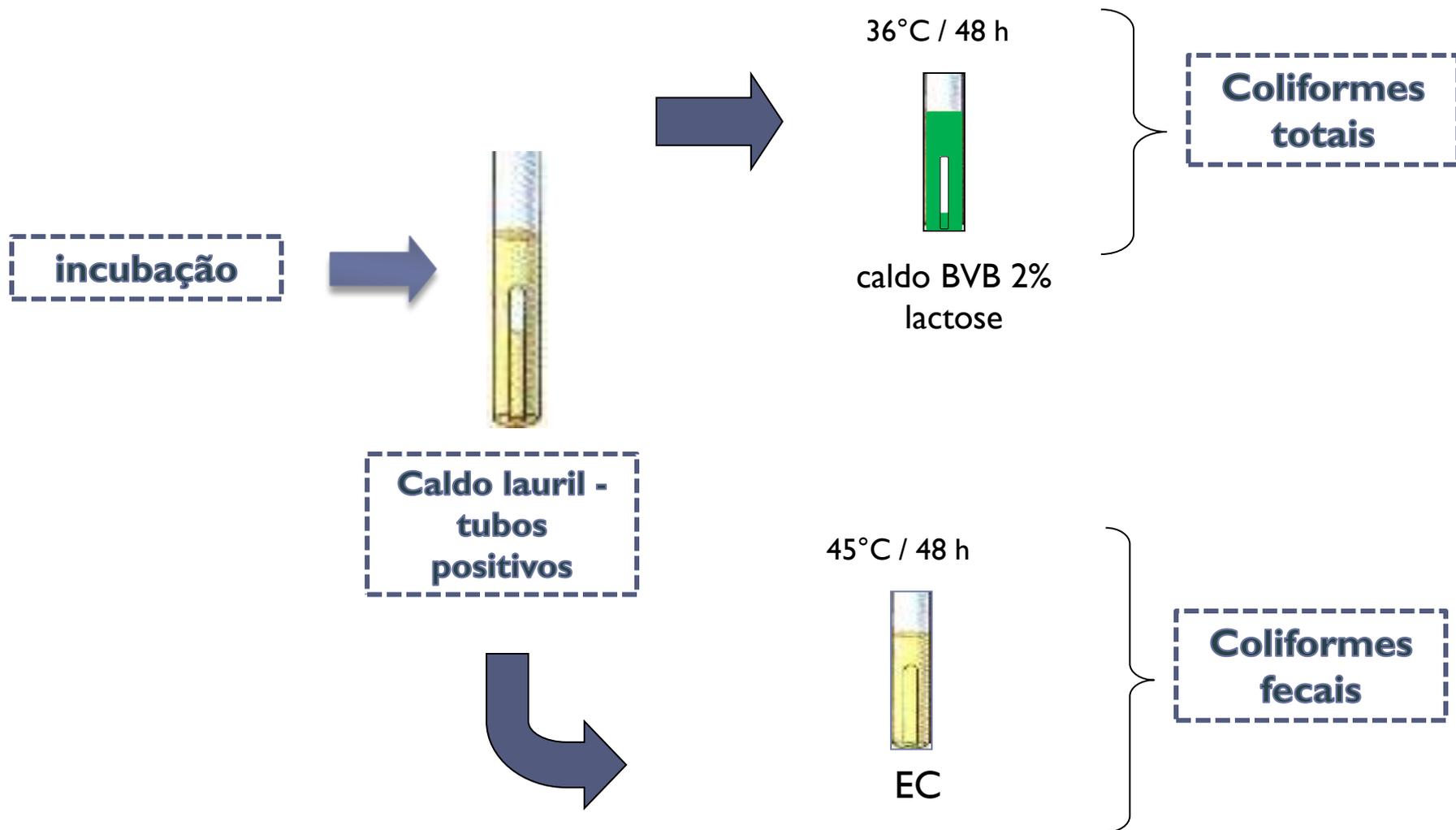
- ▶ eleger a melhor diluição que se encontra dentro do parâmetro (15 - 150)
- ▶ contar as colônias em cada placa
- ▶ fazer a média aritmética das placas
- ▶ multiplicar pelo inverso da diluição e fator correção do volume semeado
- ▶ resultado em UFC/g ou mL (1 dígito antes e 1 dígito depois da vírgula)



Coliformes – Prova Presuntiva



COLIFORMES – CONFIRMAÇÃO



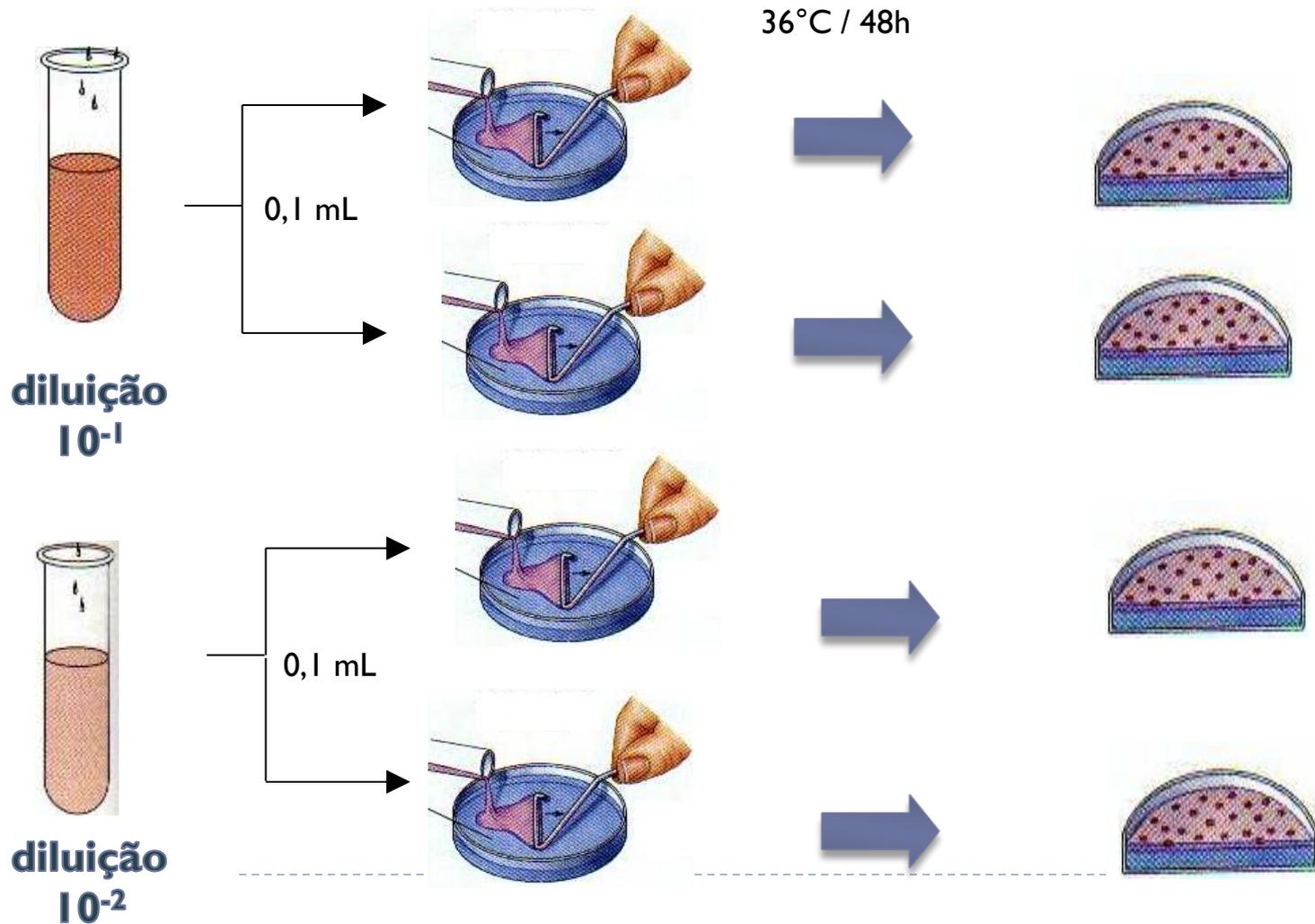
COLIFORMES - RESULTADOS

- ▶ Escolher uma **seqüência de 3 diluições, iniciando com a máxima contaminação observada**; se possível incluir uma diluição em que os 3 tubos são negativos
- ▶ Consultar o resultado obtido na tabela de NMP
- ▶ Multiplicar o valor obtido pelo fator da diluição
- ▶ Expressar o resultado em NMP/g ou mL

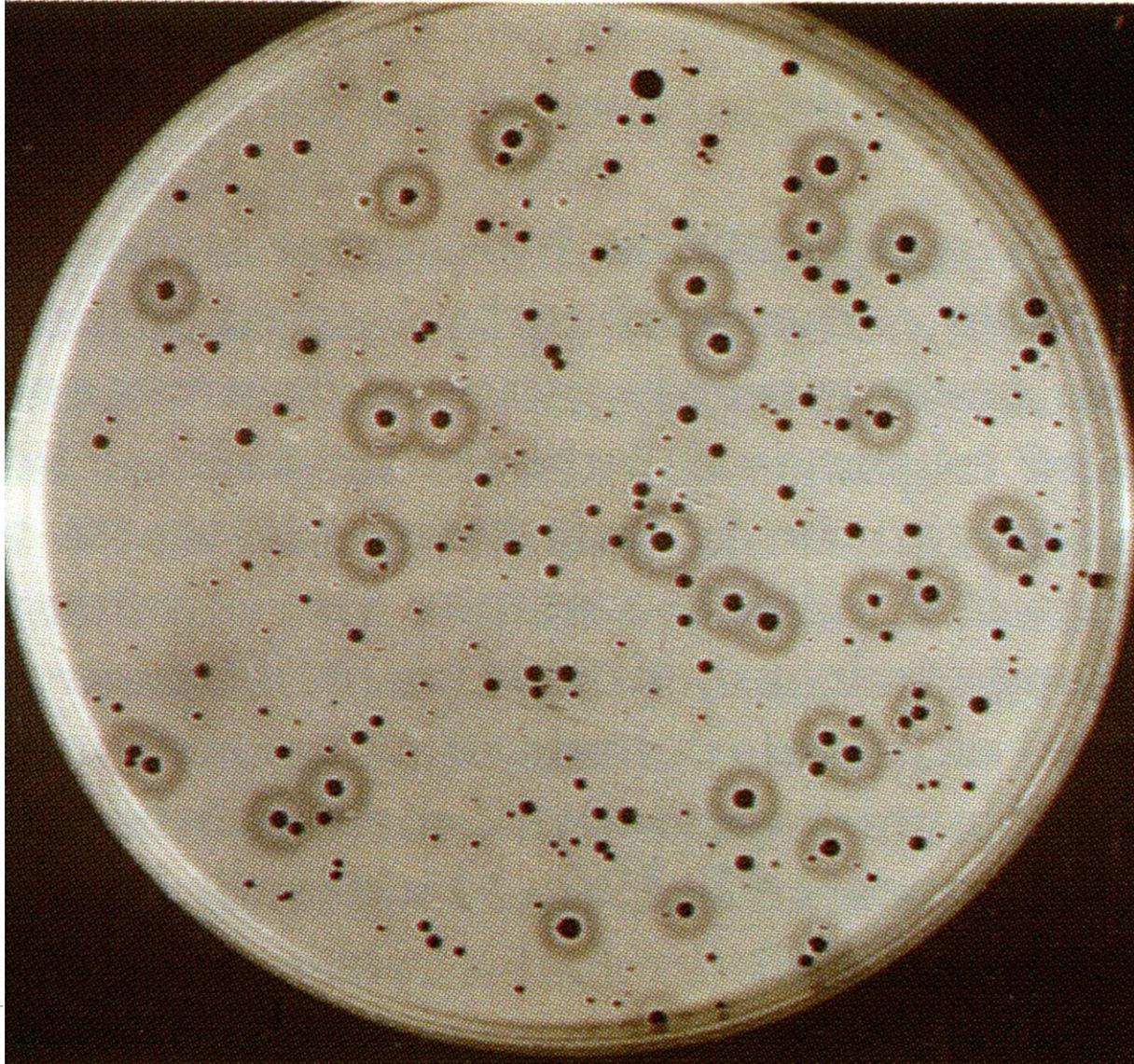


CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVO

semeadura em superfície
ágar Baird Parker



Contagem de *Staphylococcus*



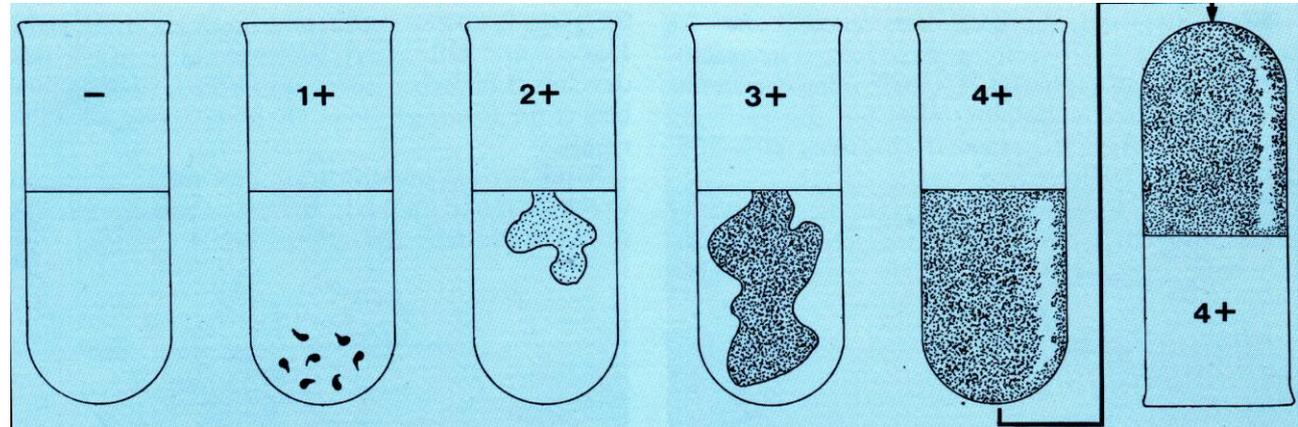
STAPHYLOCOCCUS - RESULTADOS

- ▶ escolher a melhor diluição para contagem (20 - 200)
- ▶ contar as colônias típicas e atípicas em cada placa e fazer média aritmética
- ▶ selecionar 5 colônias de cada tipo (Típica e Atípica)
fazer o teste de coagulase



Coagulase

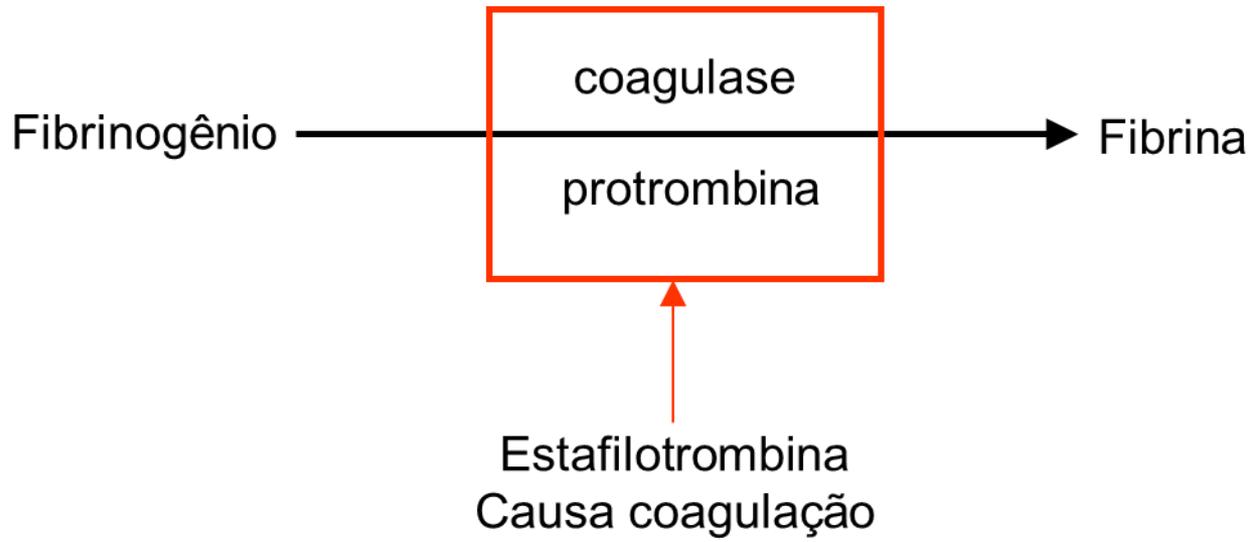
tubos com BHI + plasma de coelho



observação da coagulação
35°C/ 6-24 h

10 tubos de BHI
uma colônia por tubo
35°C/ 24 h

- coágulos 1+ e 2+: reação duvidosa => testes complem. catalase, gram e termonuclease: reação positiva se +,+,+
- coágulos 3+ e 4+: reação positiva



coagulase: resultados

Colônias Típicas

Média **Contada**: 20 colônias

5 **repicadas** / 4 **confirmadas**

Colônias atípicas

Média **Contada**: 10 colônias

5 **repicadas** / 2 **confirmadas**

$$R = (C \times c \times d) / r$$

$$R_t = (20 \times 4 \times 100) / 5$$

$$R_t = 1600$$

$$R_a = (10 \times 2 \times 100) / 5$$

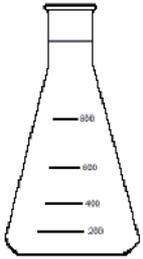
$$R_a = 400$$

$$(R_t + R_a) \times 10 = 2000 \times 10 = 2,0 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$$



Salmonella spp.

enriquecimento



Solução salina
peptonada 1%
36°C/16-20 h

1 mL



10 mL

caldo Rappaport

1 mL

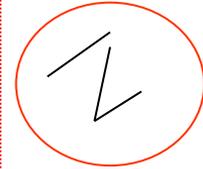


10 mL

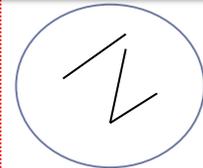
caldo selenito-cistina

enriquecimento
Seletivo
41°C/24-30 h

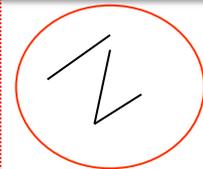
Isolamento
36°C/18-24 h



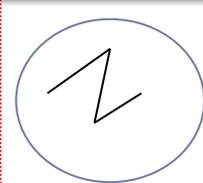
agar BVB



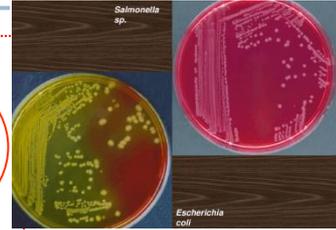
agar Rambach



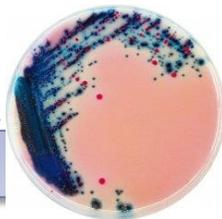
agar BVB



agar Rambach



suspeitas



Salmonella spp. - CONFIRMAÇÃO



suspeitos

TSI
36°C/18-24 h

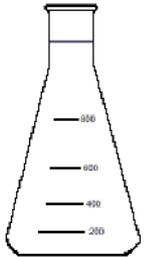
lâmina para reação sorológica
(anti soro O e H)

PCR



Listeria monocytogenes

enriquecimento



Caldo UVM
30°C/24 h

0,1 mL



enriquecimento
seletivo

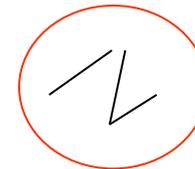


10 mL

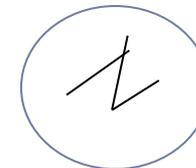
caldo Fraser

30°C/48 h

isolamento



ágar Palcam



ágar Oxford
ATN

ALOA

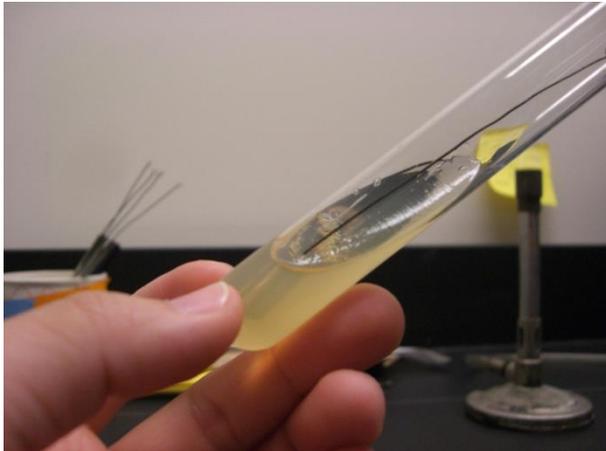
30°C/24-48 h

suspeitos



Listeria monocytogenes- confirmação

purificação



ágar ATN

30°C/24 h

**Provas bioquímicas/
Fenotípicas
(catalase, gram,
motilidade, redução
nitrito, VM/VP)**

***L. monocytogenes*: alfa
hemólise, camp test e
fermentação carboidratos**

**ou
PCR**

RESULTADOS

- ▶ Microrg. aerób. estr. fac. viáveis
 - ▶ Bolor e levedura
 - ▶ *Staphylococcus* coagulase positiva
 - ▶ Coliformes totais
 - ▶ Coliformes fecais
 - ▶ *Salmonella* spp
 - ▶ *Listeria monocytogenes*
- UFC /g ou mL
- NMP / g ou mL
- Presença ou Ausência em 25 g ou mL

