

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Métodos analíticos para detecção e enumeração de microrganismos em alimentos: tradicionais e inovadores

Profa. Dra. Daniele F. Maffei

1

Questionamentos

- ❖ Por que realizar análise microbiológica dos alimentos?
- ❖ Quais microrganismos ou grupos microbianos devem ser pesquisados?
- ❖ Quais características são importantes nos métodos de análise microbiológica?
- ❖ Quais as tendências na análise microbiológica de alimentos?

2

Questionamentos

Por que realizar análise microbiológica dos alimentos?

- Assegurar a qualidade e segurança microbiológica das matérias primas e/ou ingredientes utilizados, bem como dos alimentos produzidos.
- Obter aprovação para realização de testes de análise sensorial de produtos.
- Identificar patógenos envolvidos em surtos de origem alimentar.

3

Questionamentos

Quais micro-organismos ou grupos microbianos devem ser pesquisados?

Depende do contexto:

- Análises de rotina (micro-organismos indicadores).
- Validação dos processos de esterilização.
- Ocorrência de surtos (alimento envolvido, sintomatologia dos indivíduos afetados etc.).

4

Questionamentos

Quais características são importantes nos métodos de análise microbiológica?

- Devem ser validados, aprovados e reconhecidos
- Econômicos
- Seletivos
- Reprodutíveis

5

Questionamentos

Quais as tendências na análise microbiológica de alimentos?

- Métodos validados, aprovados e reconhecidos
- Redução de insumos necessários e resíduos gerados
- Custo x benefício
- Métodos sensíveis, rápidos e precisos

6

Métodos de análise microbiológica

7

Métodos de análise microbiológica

- ❖ Métodos tradicionais ou convencionais.
- ❖ Métodos rápidos ou alternativos.

8

Métodos de análise microbiológica

Métodos tradicionais ou convencionais

Vantagens

- ✓ São métodos oficiais, validados e reconhecidos.
- ✓ Simplicidade e custo.
- ✓ Amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa e de prestação de serviços.

9

Métodos de análise microbiológica

Métodos tradicionais ou convencionais

Desvantagens

- ✓ Trabalhosos.
- ✓ Requerem muito material de laboratório.
- ✓ Recursos humanos treinados.
- ✓ Resultados demorados.

10

Métodos de análise microbiológica

Métodos rápidos ou alternativos

Vantagens

- ✓ Simplificação do trabalho: prontos para uso, requerem menos suprimentos de laboratório.
- ✓ Requerem menos mão de obra.
- ✓ Resultados mais rápidos.
- ✓ Muitos já são validados e reconhecidos.

11

Métodos de análise microbiológica

Métodos rápidos ou alternativos

Desvantagens

- ✓ Custo elevado?
- ✓ Métodos para detecção de patógenos – triagem, todo resultado positivo é apenas presuntivo, necessitando de confirmação pelos métodos convencionais de cultivo.

12

Procedimentos para enumeração ou deteção de microrganismos

13

Preparo da amostra para análise

- ✓ Registrar dados sobre a amostra (produto, solicitante, data e local de coleta/análise);
- ✓ Observar as condições de embalagem e desinfetá-la com álcool 70%;
- ✓ Homogeneizar o produto;
- ✓ Abrir assepticamente a embalagem (fluxo laminar ou bico de Bunsen, além de instrumentos e utensílios estéreis).

14

Preparo da amostra para análise

- ✓ Retirar a unidade analítica (25 g ou mL)

Amostras líquidas (viscosidade ≤ leite) – utilizar uma pipeta;

Amostras sólidas ou líquidos concentrados – se for heterogênea, compor a unidade analítica com porções das diferentes camadas;

Carcaças de animais, embalagens – técnica do esfregão de superfície ("swabs" ou esponjas estéreis);

Carcaças pequenas, grãos, sementes e similares – técnica da lavagem superficial.

15

Preparo da amostra para análise

- ✓ Homogeneização da amostra

Em geral, 25 g ou mL da amostra em 225 mL diluente estéril (diluição 1:10)

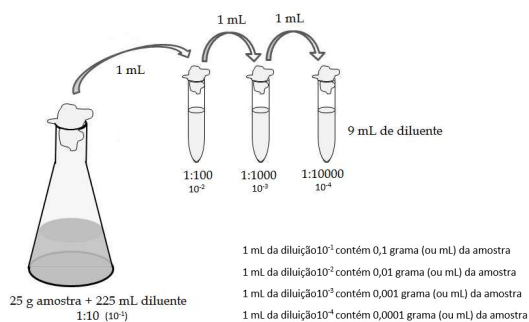
- solução peptonada 0,1%
- solução salina 0,85%
- tampão fosfato pH 7,2
- solução salina peptonada

Pode ser utilizado liquidificador (não é ideal) ou *stomacher* (30-60 segundos)

16

Preparo da amostra para análise - enumeração

Se o ensaio for de enumeração: diluição seriada da amostra.

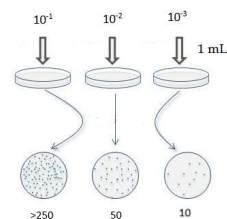


17

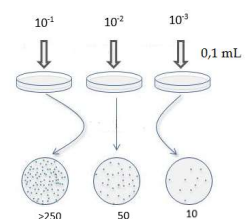
Técnicas básicas de enumeração

Semeadura

Semeadura em profundidade



Semeadura em superfície

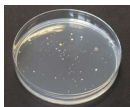


18

Técnicas básicas de enumeração

Contagem em placas

- ❖ Mede o número de células viáveis;
- ❖ São necessárias ao menos 24 h para que colônias visíveis sejam formadas;
- ❖ As contagens em placas consideram que cada bactéria viva cresce e se divide para produzir uma única colônia – UFC;
- ❖ Importante ter um número limitado de colônias na placa (25 – 250 colônias).



19

Técnicas básicas de enumeração

Método do Número Mais Provável (NMP)

- ✓ Permite estimar a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra.
- ✓ Esta técnica não permite a contagem "fixa" de células viáveis ou de unidades formadoras de colônias, como acontece com a técnica de contagem em placas.

Recomendada quando é esperado um baixo número do micro-organismo alvo (<100/g ou mL) ou quando, devido ao processo tecnológico sofrido pelo alimento, as células presentes estejam lesadas fisiologicamente (células estressadas), não tendo portanto condições de formar colônias em meios sólidos seletivos.

20

Técnicas básicas de enumeração

Outros métodos para medida do crescimento microbiano

Membrana filtrante

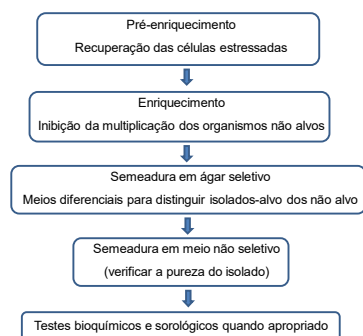
Método empregado quando a quantidade de bactérias é muito pequena (ex. corrente de água).

Contagem microscópica direta

Consiste em fazer um esfregaço com a amostra de alimento ou cultura microbiana sob uma lâmina de microscópio, corar com um corante apropriado, visualizar e contar as células com auxílio do microscópio (= rapidez, simplicidade).

21

Técnicas básicas de detecção



22

Principais métodos rápidos (alternativos) disponíveis no mercado

Métodos rápidos (alternativos)

Principais métodos rápidos (alternativos) disponíveis no mercado

- Meios de cultura modificados
- Sistemas prontos para uso
- Métodos bioquímicos miniaturizados
- Métodos imunológicos
- Métodos moleculares
- Outros

23

24

Métodos rápidos (alternativos)

Meios de cultura modificados

Ex. substrato cromogênico e fluorogênico.

Deteção simultânea qualitativa ou quantitativa de coliformes totais e *E. coli*

Contém o indicador cromogênico **ONPG** (orto-nitrofenil-galactopiranosídeo) e também o indicador fluorogênico **MUG** (4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo);

Coliformes metabolizam o ONPG pela presença da enzima β -galactosidase, desenvolvendo a **cor amarela**;

E. coli metaboliza o MUG pela presença da enzima β -glucuronidase, desenvolvendo **fluorescência** quando exposto a luz UV.

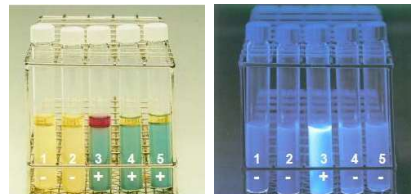
25

Métodos rápidos (alternativos)

Água



Alimentos



26

Métodos rápidos (alternativos)

Sistemas prontos para uso

Ex. 3M™ Petrifilm™.

Sistema de meio de cultura pronto.

Disponíveis para contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *E. coli*, estafilococos, bactérias lácticas etc.

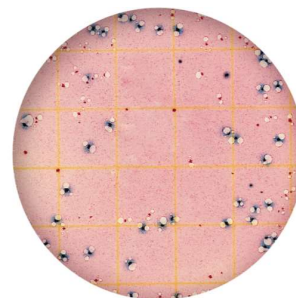
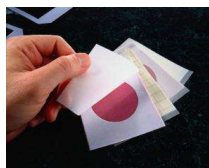
Ex. Deteção simultânea de coliformes totais e *E. coli* (24-48 h).

Coliformes confirmados - colônias **vermelhas** com bolhas de gás associadas.

E. coli confirmada - colônias **azuis** com bolhas de gás associadas.

27

Métodos rápidos (alternativos)



28

Métodos rápidos (alternativos)

Métodos bioquímicos miniaturizados

Ex. sistema API® 20E (Biomérieux)

Versão miniaturizada de provas bioquímicas convencionais para identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativo.



29

Métodos rápidos (alternativos)

Métodos imunológicos

São métodos analíticos baseados em reações entre antígenos e anticorpos específicos para esses antígenos.

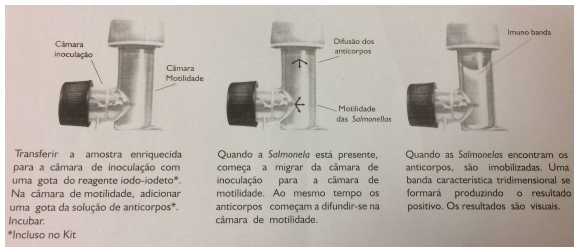
Ex. técnica imunoenzimática, imunofluorescência, imunomobilização, imunocromatográficas.

Ex. 1-2 Test® BioControl

Utiliza uma combinação de enriquecimento seletivo, meio de motilidade e anticorpos específicos para imunomobilização de *Salmonella*.

30

Métodos rápidos (alternativos)



31

Métodos rápidos (alternativos)

Métodos moleculares



32

Referências

FRANCO, B.G.G.M. *Métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos: estudo crítico e avaliação de novas metodologias*. Tese (Livre Docência) apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1994.

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M. L. (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 5th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2015.

33