QUAL A IMPORTÂNCIA DOS MÉTODOS DE REFERÊNCIA NO CONTROLE DE ALIMENTOS?

Muitos dos alimentos que não são submetidos a análises microbiológicas tornam-se um risco à saúde, pois, podem causar uma ampla variedade de doenças. As doenças diarreicas, por exemplo, são a principal causa de morte em crianças e a segunda em adultos, e em muitos casos são relacionados com a ingestão de alimentos contaminados. Por isso é necessário estabelecer critérios microbiológicos para garantir a segurança dos alimentos e proteger a saúde do consumidor.

O desenvolvimento de critérios para o controle microbiológico de alimentos implica, entre outras coisas, a fixação do método analítico a ser utilizado para garantir conformidade com esses critérios. Estes métodos desenvolvidos por organizações como ISO ou CEN, podem ser considerados como métodos de referência e muitas vezes, de difícil implementação e aplicação nos laboratórios.

Atualmente, a estratégia no desenvolvimento e atualização desses métodos da ISO visa melhorá-los através da simplificação e incorporação de novas tecnologias, para que possam ser utilizadas regularmente em laboratórios de controle de alimentos.

O uso de métodos padronizados para conduzir análises microbiológicas é uma ferramenta que permite os laboratórios utilizarem métodos de teste reconhecidos internacionalmente, o que contribui para a produção de resultados comparáveis, sem sacrificar a sua confiabilidade, garantindo a qualidade e segurança dos alimentos sujeitos a controle.

Por esse motivo, é cada vez mais comum que esses métodos padronizados sejam utilizados como referência por órgãos de acreditação, assim como para estabelecer critérios microbiológicos (Regulamentações EU 2073/2005 e 1441/2007) onde os padrões internacionais desenvolvidos pelos Comitês ISO e CEN são considerados como método de referência.

SUMÁRIO

Contagem de **Microrganismos mesófilicos** ____ **05**
Procedimento definido de acordo com ISO 4833:2013

Contagem de **Leveduras e Fungos** ____ **06**
Procedimento definido de acordo com ISO 21527:2008

Detecção de ***Salmonella* spp** ____ **07**
Procedimento definido de acordo com ISO 6579:2017

Detecção e enumeração de ***Listeria* spp** ____ **09**
Procedimento definido de acordo com ISO 11290:2017

Detecção e enumeração de ***Campylobacter* spp** ____ **11**
Procedimento definido de acordo com ISO 10272:2017

Detecção de ***Cronobacter* spp** ____ **13**
Procedimento definido de acordo com ISO 22964:2017

Contagem presuntiva de ***Bacillus cereus*** ____ **14**
Procedimento definido de acordo com ISO 7932:2004

Detecção e enumeração de **Enterobactérias** ____ **15**
Procedimento definido de acordo com ISO 21528:2017

Contagem de ***Clostridum perfiringes*** ____ **16**
Procedimento definido de acordo com ISO 7937:2004

Detecção e contagem de ***Staphylococcus*** **coagulase positiva** ____ **17**
Procedimento definido de acordo com ISO 6888

Detecção de ***Yersinia enterocolítica*** **patogênica** ____ **19**
Procedimento definido de acordo com ISO 10273:2017

Detecção e enumeração de ***Shigella*** **spp** ____ **20**
Procedimento definido de acordo com ISO 21567:2004

Detecção e enumeração ***Escherichia coli*** ____ **21**
Procedimento definido de acordo com ISO 7251: 2005 / ISO 16649:2015

Contagem de **Coliformes totais** ____ **23**
Procedimento definido de acordo com ISO 4832:2006

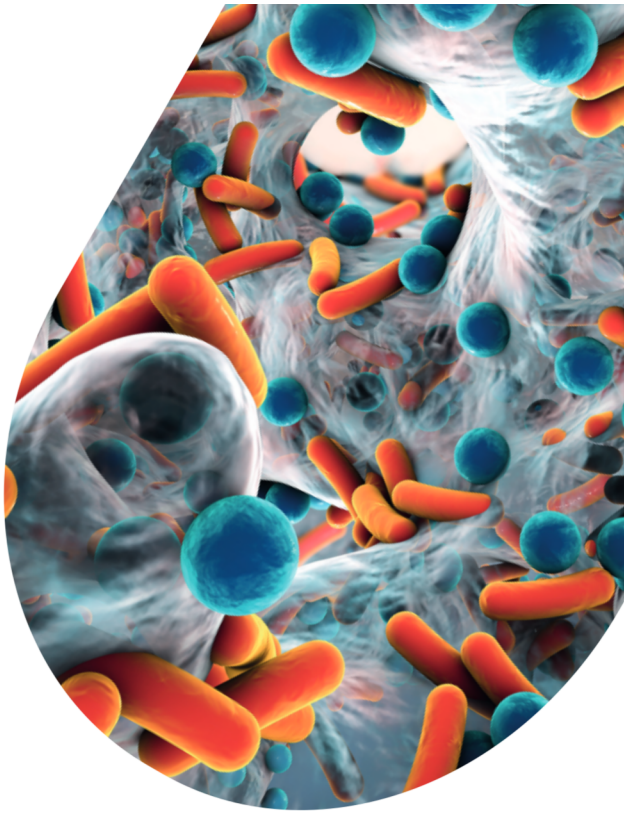
Detecção de ***Escherichia coli*** O157 ____ **24**
Procedimento definido de acordo com ISO 16654:2001

Detecção de ***Vibrio*** **spp** ____ **25**
Procedimento definido de acordo com ISO 21872:2007

Detecção e enumeração de **outros microrganismos na indústria de alimentos** ____ **26**
Procedimento definido de acordo com ISO 15213:2003/ ISO 13720:2010/ ISO 6611:2004 / ISSO 15214: 1998

CONTAGEM DE MICRORGANISMOS MESÓFILICOS

Procedimento definido de acordo com ISO 4833:2013



INTRODUÇÃO

As bactérias são consideradas a causa principal de doenças que têm como raiz o consumo de alimentos contaminados. Sinais de deterioração ou possível contaminação são indicados quando os alimentos apresentam alteração na sua cor, textura ou consistência. Para crescer, as bactérias precisam de:

- Nutrientes como o carbono, nitrogênio, hidrogênio e fósforo (entre outros) presentes nos alimentos.
- Água como um elemento fundamental, pois, na sua ausência, o crescimento bacteriano é suspenso.
- Um pH adequado, oscilando em torno de um valor neutro (6-7). Em um pH muito baixo ou muito alto, o crescimento bacteriano é suspenso.

A análise desse grupo de bactérias inclui todos os microrganismos capazes de se desenvolverem na presença de oxigênio entre temperaturas de 20°C a 45°C. A contagem de microrganismos mesófilicos aeróbios, sob condições estabelecidas, estima a microflora total do produto mas sem especificar e identificar o tipo de microrganismo.

BIBLIOGRAFIA

AFSA, 2001. Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in food. Final report Contract SMT4/CT96 2098. Coordination by Agence Française de Securité Sanitarie des Aliments. AFSSA, France, February 2001.

ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony-count at 30 degrees C by the pour plate technique.

ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 2: Colony-count at 30 degrees C by the surface plate technique.

MÉTODO

SUSPENSÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 específica para o produto analisado.

MEIO DE CONTAGEM

1mL de amostra diluída em Agar Contagem de Placas (PCA) (K25-1056).

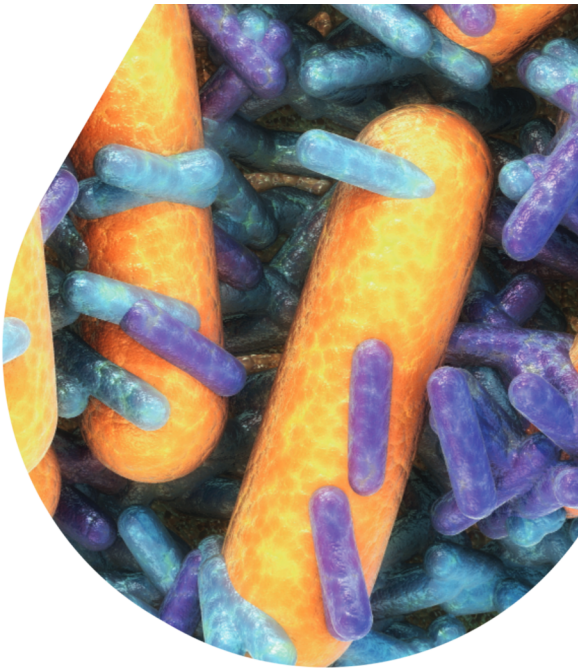
Incubação: 30°C ± 1°C // 72 ± 3h.

Para a análise de produtos laticínios, o meio de cultura deve conter 1 g/L de leite em pó desnatado: Agar Contagem de Placas (PCA) com leite em pó (K25-1033).

NOTA: Para este padrão, dois métodos podem ser diferenciados. Ambas as seções da norma estabelecem o mesmo protocolo de trabalho, mas advertem que, para certas matrizes, resultados diferentes podem ser obtidos de acordo com a seção seguida.

CONTAGEM DE LEVEDURAS E FUNGOS

Procedimento definido de acordo com ISO 21527:2008



INTRODUÇÃO

Alimentos que possuem fungos em sua superfície, podem apresentar toxinas no seu interior, constituindo um risco para reações alérgicas. Quando fungos aparecem na superfície de alimentos, as suas raízes já invadiram uma porção significativa do produto. Os fungos se alimentam de matéria vegetal e/ou animal e contêm esporos que podem ser transportados através do ar, água ou insetos.

Os fungos são encontrados principalmente em alimentos como frutas, vegetais, pão úmido e queijos. É possível diferenciar diferentes tipos dependendo do seu comportamento. Aspergillus ou Penicillium são alguns dos fungos mais frequentemente encontrados. Os filamentos em sua estrutura, as hifas, produzem enzimas que podem quebrar as moléculas mais duras. Sob condições adequadas (temperatura e umidade quentes), o fungo produz micotoxinas, substâncias capazes de causar doenças e aparecem principalmente em cereais e nozes.

BIBLIOGRAFIA

VALERIE T., MICHAEL T.S., PHILIP B., MISLIVEC, HERBERT A.K. AND RUTH B.BAM: Yeast, Molds and Mycotoxins. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.

ISO 21527-1:2008. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.

ISO 21527-2:2008. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity less than or equal 0,95.

MÉTODO

Produtos com Atividade de água > 0,95 (ISO 21527-1)

SUSPENÇÃO INICIAL

Com exceção de preparações envolvendo amostras específicas (ISO 6887-1), recomenda-se a diluição em Água Peptona Tamponada (K25-1402).

MEIO DE CONTAGEM

0.1mL de amostra diluída em Agar Rosa Bengala + Cloranfenicol + Dicloran (Agar DRBC) (K25-1160).

Incubação: 25 °C ± 1°C / 5 dias

Produtos com Atividade de água > 0,95 (ISO 21527-2)

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 específica para o produto a ser analisado.

Exceto para preparações envolvendo amostras específicas, recomenda-se a diluição em Água Peptona Tamponada (K25-1402).

MEIO DE CONTAGEM

0,1mL de amostra diluída em Agar Dicloran Glicerol (DG-18) (K25-1161)

Incubação: 25 °C ± 1°C / 5 -7 dias

DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 6579:2017

INTRODUÇÃO

Salmonella é uma família muito diversificada de microrganismos, incluindo aproximadamente 2.300 sorotipos diferentes. Estima-se que essa família de bactérias seja a causa de milhões de hospitalizações no mundo todo (1,2 milhões de pessoas apenas no Estados Unidos) mas esse número aumentaria em 30 vezes se as infecções não diagnósticas fossem consideradas nessa estatística, pois, elas geralmente causam um processo diarreico.

Esse grupo de bactérias é gram-negativo (pertencente ao grande grupo das Enterobacteriaceae), anaeróbico facultativo e móveis por flagelos. Esses fungos são fermentadores de glicose, mas não fermentam lactose e não produzem uréase.

Salmonella etá presente no intestino de pessoas e animais, carne crua, ovos e leite pasteurizado. A temperatura ideal de crescimento dessa bactéria está entre 30°C e 37°C; portanto, é especialmente importante adotar medidas preventivas nos meses mais quentes do ano, quando o risco aumenta consideravelmente.

BIBLIOGRAFIA

AFSA, 2001. Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in food. Final report Contract SMT4/CT96 2098. Coordination by Agence Française de Securité Sanitarie des Aliments. AFSSA, France, February 2001.

ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration and Serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation on test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

MÉTODO

PRÉ-ENRIQUECIMENTO

25g de amostra + 225mL de Água Peptona Tamponada (K25-1402)

Incubação: 34 °C a 38 °C – 18 ± 2h

Para amostras ambientais da fase de produção primária ou fezes, espalhar diretamente sobre o Ágar MSRV (K25-1376).

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

0,1mL + 10mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (K25-1174) ou Agar MSRV (Meio semissólido Rappaport Vassiliadis modificado) (K25-1376)

Incubação: 41,5 °C ± 1°C – 24 ± 3h.

Aviso: Ao incubar a placa de MSRV, não deve-se inverte-la.

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

1mL +10mL de Caldo Muller Kaufmann com verde brilhante e Novobiocina MKTTN (K25-1173)

Incubação: 37 °C ± 1°C – 24 ± 3h

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) (K25-1274)

Incubação: 41,5 °C ± 1°C – 24 ± 3h.

ISOLAMENTO SELETIVO

Selecionar um meio secundário entre os listados abaixo:

Agar Salmonella Shigella (SS Agar) (K25-1064)

Agar Hektoen Entérico (K25-1030)

Agar Verde Brilhante Modificado (K25-1143)

Agar Bismuto Sulfito (K25-1011)

Agar Cromogênico *Salmonella* (K25-1122)

Para leitura de resultados e seleção de colônias suspeitas, verificar as instruções de uso de cada produto. Em seguida, selecionar uma única colônia suspeita para espalhar em um meio de cultura não seletivo. Se o resultado for negativo, testar 4 colônias suspeitas previamente marcadas.

ISOLAMENTO EM AGAR NÃO SELETIVO

Agar Nutriente (K25-1060) ou Agar Nutriente enriquecido com Cloreto de Sódio (NaCl) (K25-1355)

Incubação: 34 - 38 °C – 24 ± 3h.

CONFIRMAÇÃO

Completar a análise com um teste bioquímico e sorológico nas colônias cultivadas em ágar não seletivo.

O teste bioquímico deve consistir em:

- Agar Triplice Açúcar Ferro ISO (TSI) (K25-1172)
- Agar Uréia Base (K25-2000)
- Meio Lisina Descarboxilase (K25-1176)
- β-galactosidase (opcional)
- Reação indol (opcional)

NOTA: De acordo com o Apêndice D da ISO 6579-1:2017, o procedimento para a detecção de subespécies entéricas (*S. typhi* e *S. paratyphi*) devem ser os seguintes:

1. Adicionar o Caldo Selenito Cistina (K25-1220) como enriquecimento seletivo.

2. Adicionar um meio seletivo secundário, Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) (K25-1011) seguida.

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *LISTERIA* SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 11290:2017

INTRODUÇÃO

Bactérias gram-positivas com morfologia de basófilos pertencem ao gênero *Listeria*. É um gênero composto por apenas 6 espécies, sendo a *Listeria monocytogenes* a mais importante entre elas pois é uma espécie patogênica presente em alimentos apropriados para consumo humano.

L. monocytogenes causa listeriose (intoxicação alimentar com uma taxa de mortalidade próxima de 30%). Essas bactérias são gram-positivas, muito pequenas no tamanho, catalase-positiva e não esporulentas. Elas são anaeróbias facultativas, capazes de crescer em uma ampla faixa de temperatura (1 °C a 45 °C) e em altas concentrações de sal. Além disso, a *L. monocytogenes* é um microrganismo flagelado, e com isso móvel, o que aumenta a sua patogenicidade.

Este microrganismo é amplamente distribuído na natureza e é muito comum encontrá-lo em indústrias de processamento alimentar, onde sua capacidade de sobrevivência em larga faixa de temperaturas o torna, talvez, um dos principais microrganismos que devem ser controlados nesse setor.

BIBLIOGRAFIA

KATHARIOUS S. Listeria monocytogenes virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food Prot. 2002; 65: 1881-1829.

ISO 11290-1. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes and Listeria spp - Part 1: Detection Method.

ISO 11290-2. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes and Listeria spp - Part 2: Enumeration Method.

MÉTODO

1. MÉTODO DE DETECÇÃO (ISO 11290-1)

ENRIQUECIMENTO SELETIVO PRIMÁRIO

25g/mL de amostra + 225mL de Caldo Base Listeria Half-Fraser (K25-1183 + K25-6050)

Incubação: 30°C ± 1°C – 25 + 2h

Após essa etapa, é possível seguir diretamente para o espalhamento direto no Agar Seletivo (ALOA) sem enriquecimento seletivo secundário.

ENRIQUECIMENTO SELETIVO SECUNDÁRIO

0,1mL de cultura primária + 10mL de Caldo Base Listeria Fraser (K25-1182 + K25-6050)

Incubação: 37°C ± 1°C – 24 ± 2h

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Cromogênico-Listeria Base de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA) (K25-1345) e Suplementos Listeria Lipase C + Suplemento Seletivo Cromogênico Listeria (K25-6031+ K25-6040)

Incubação: 37°C ± 1°C – 24/48 ± 2h

ISOLAMENTO SELETIVO

Como meio secundário, selecionar uma das opões abaixo:

Agar Oxford (K25-1133 + K25-6003)

Agar Listeria Palcam (K25-1141 + K25-6004)

Leitura de colônias suspeitas de *Listeria monocytogenes* em Agar ALOA colônias de cor azul-esverdeada com halo opaco (considerar também aqueles sem um halo para Listeria spp). Para leitura de colônias em um segundo ágar, deve-se verificar temperatura e tempo de incubação nas instruções de uso do produto.

ISOLAMENTO EM AGAR NÃO SELETIVO

Selecionar uma das opões abaixo:

Agar Nutriente (K25-1060), Agar Nutriente Enriquecido com Cloreto de Sódio (NaCl) (K25-1355),

Agar Sangue nº 2 (K25-1328), Agar Extrato de Levedura de Soja Triptona (K25-1398) ou Caldo Extrato de Levedura Triptona de Soja (TSYEB) (K25-1339)

Incubação: verificar conforme as instruções de uso.

CONFIRMAÇÃO DE *L.MONOCYTOGENES*

Microscopia

Atividade Hemolítica -Agar Sangue nº 2 (K25-1328)

Caldo Base Carboidratos (K25-1342)

Catalase (opcional)

Motilidade (opcional)

Teste CAMP (opcional)

CONFIRMAÇÃO DE *LISTERIA* SSP

Microscopia

Catalase

Motilidade (opcional)

Reação de Voges-Proskauer (opcional)

2. MÉTODO DE ENUMERAÇÃO (ISO 11290-2)

SUSPENÇÃO INICIAL

Xg/mL de amostra + 9x g/mL de diluente de acordo com a ISO 6887

Quando a enumeração é realizada na mesma amostra que a detecção, deve-se utilizar o Caldo Base Listeria Half-Fraser (K25-1183) e o Caldo Base Listeria Fraser (K25-1183) nas mesmas proporções indicadas acima.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Cromogênico Listeria de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA) (K25-1345) e Suplemento Suplementos Listeria Lipase C + Suplemento Seletivo Cromogênico Listeria (K25-6031+ K25-6040)

Incubação: 37 °C ± 1 °C

Leitura de colônia suspeita com *Listeria monocytogenes* em Agar ALOA (K25-1345): colônias de cor azul-esverdeada com halo opaco (considerar também aqueles sem halo para *Listeria spp*).

ISOLAMENTO EM AGAR NÃO SELETIVO

Selecionar uma das opões abaixo:

Agar Sangue nº (K25-1328) ou Agar Extrato de Levedura de Soja Triptona (TSYEA) (K25-1398)

Incubação: 37 °C ± 1

CONFIRMAÇÃO DE *L.* MONOCYTOGENES

Microscopia

Atividade Hemolítica -Agar Sangue nº 2 (K25-1328)

Caldo Base Carboidratos (K25-1342)

Catalase (opcional)

Motilidade (opcional)

Teste CAMP (opcional)

CONFIRMAÇÃO DE LISTERIA SPP

Microscopia

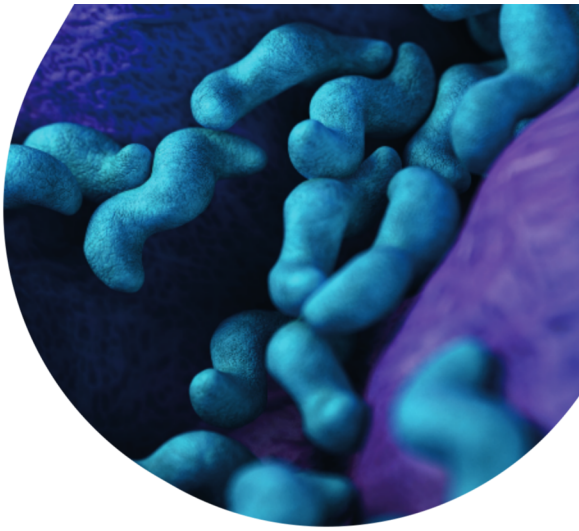
Catalase

Motilidade (opcional)

Reação de Voges-ProsKauer (opcional)

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 10272:2017



INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são bacilos gram-negativos em formato de vírgula ou espiral curva, móveis por flagelos unipolares ou bipolares e microaerofílicos.

São bactérias termofílicas com crescimento ótimo entre as temperaturas de 42º-43°C., além disso, esses microrganismos são os causadores mais frequentes de gastroenterite em humanos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS 2011) considera que a nível global o *Campylobacter* é uma das causas primárias de doenças diarreicas transmitidas por alimentos. A maioria dos casos de campilobacteriose estão associados com o consumo de alimentos, principalmente aves; portanto, essas bactérias representam prioridade máxima na segurança alimentar.

MÉTODO

1. Detecção por Enriquecimento: amostras com baixa concentração de Campylobacter acompanhada de baixos níveis de microflora (produtos cozidos ou congelados).

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

10 g/mL de amostra + 90mL de Caldo Bolton (K25-1441 + K25-6070)

Incubação em atmosfera microaeróbia: 37 °C – 4h / 6h e 41,5°C – 44h ± 2h

ISOLAMENTO PRESUNTIVO

Agar Campylobacter sem sangue (CCDA) (K25-1129 + K25-6053)

Incubação em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 44h ± 2h

Por sua vez, espalhar em um meio seletivo secundário sob as mesmas condições de incubação. Um dos meios de cultura compatíveis com ISO é Agar Campylobacter (Preston) (K25-1131 + K25-6019)

LEITURA DOS RESULTADOS

Colônias típicas são acinzentadas, muitas vezes com tom metálico brilhante.

Elas geralmente são planas com aspecto úmido e têm uma tendência a disseminar. Outras morfologias também podem estar presentes.

CONFIRMAÇÃO

Siga os passos abaixo para colônias crescida em Agar CCDA:

- Espalhar a amostra em Agar Base Columbia + Agar Sangue (K25-1104)
- Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 24/48h
- Examinar a morfologia e a motilidade em microscópio: bacilos móveis, flagelados e curvados.
- Estudar o crescimento aeróbico a 25°C: Crescimento negativo em Agar Columbia (K25-1104) sob condições aeróbicas durante 44 ± 4h
- Atividade de Oxidase (+)
- Teste de coagulase (+)

BIBLIOGRAFIA

AESAN (2012). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de Campylobacter spp. en carne fresca de aves (pollo). Revista del Comité Científico, Nº 16: 21-55.

OMS (2011) Campylobacter. Nota descriptiva núm. 255. Octubre de 2011.

UNE-EN-ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection Method.

UNE-EN-ISO 10272-2:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 2: Colony Count Technique.

2. Detecção Por Enriquecimento: amostras com baixa concentração de *Campylobcter* acompanhadas de altos níveis de microflora (ex.: carne ou leite cru).

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

10mg/g de amostra + 90mL de Caldo Preston (K25-2166 + K25- 6081)

Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 44h ± 2h

ISOLAMENTO PRESUNTIVO

Agar Campylobacter CCDA (K25-1129 + K25- 6053)

Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 44h ± 2h

LEITURA DOS RESULTADOS

Colônias típicas são acinzentadas, muitas vezes com um tom metálico brilhante.

Eles geralmente são planas com um aspecto úmido e têm uma tendência para disseminar. Outras morfologias também podem estar presentes.

CONFIRMAÇÃO

Siga os passos abaixo para colônias crescida em Agar CCDA:

- Espalhar a amostra em Agar Base Columbia + Agar Sangue (K25-1104)
- Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 24/48h
- Examinar a morfologia e a motilidade em microscópio: bacilos móveis, flagelados e curvados.
- Estudar o crescimento aeróbico a 25°C: Crescimento negativo em Agar Columbia (K25-1104) sob condições aeróbicas durante 44 ± 4h
- Teste de Oxidase (+)

3. Detecção por disseminação direta: amostras com altas concentrações de *Campylobacter* (como fezes, carne crua de aves)

ISOLAMENTO PRESUNTIVO

Agar Campylobacter CCDA (K25-1129 + K25- 6053)

Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5 °C – 44h ± 2h

Utilizar um meio seletivo secundário sob as mesmas condições de incubação. Um dos meios de cultura compatíveis com ISO é o Agar Preston (K25-1131+ K25- 6019).

LEITURA DOS RESULTADOS

Colônias típicas são acinzentadas, muitas vezes com um tom metálico brilhante.

Eles geralmente são planas com um aspecto úmido e têm uma tendência

para disseminar. Outras morfologias também podem estar presentes.

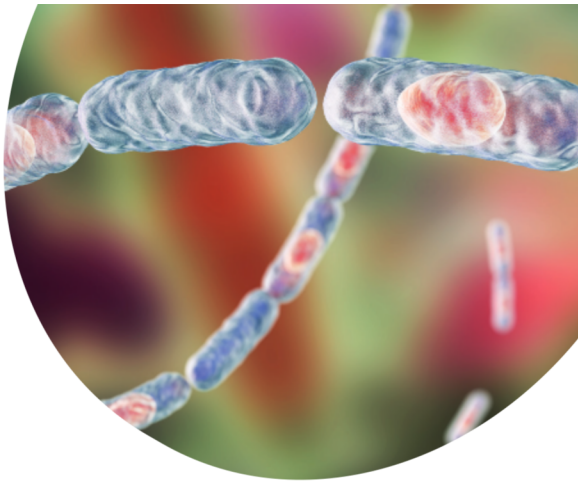
CONFIRMAÇÃO

Siga os passos abaixo para colônias crescida em Agar CCDA:

- Espalhar a amostra em Agar Base Columbia + Agar Sangue (K25-1104)
- Incubar em atmosfera microaeróbia: 41,5°C – 24/48h
- Examinar a morfologia e a motilidade em microscópio: bacilos móveis, flagelados e curvados.
- Estudar o crescimento aeróbico a 25°C: Crescimento negativo em Agar Columbia (K25-1104) sob condições aeróbicas durante 44 ± 4h
- Teste de Oxidase (+)

DETECÇÃO DE *CRONOBACTER* SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 22964:2017



INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes ao gênero Cronobacter são gram-negativas, anaeróbicas facultativas, possuem oxidase negativa e são bacilos com catalase positiva. Elas geralmente são móveis e possuem a capacidade de produzir uma variedade de ácidos provenientes de carboidratos diferentes. Na realidade, esse fator é utilizado no estágio de confirmação do método.

A espécie mais conhecida desse gênero é *Cronobacter sakazakii*. Esse microrganismo é considerado atualmente como um patógeno emergente que causa meningite grave em crianças. Esses processos podem resultar em uma taxa de mortalidade variando entre 40-80%.

MÉTODO

PRÉ-ENRIQUECIMENTO NÃO-SELETIVO

10 g/mL de amostra + 90mL DE Água Peptona Tamponada (K25-1402)

Incubação: 38°C – 24± 2h

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

0,1 mL de amostra pré-enriquecida + 10mL do Caldo Seletivo Cronobacter (K25-2143)

Incubação: 41,5°C – 24± 2h

ISOLAMENTO SELETIVO PRESUNTIVO

Agar Cromogênico para Isolamento de Cronobacter (K25-1446)

Incubação: 41,5°C – 24± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

Colônias típicas são de *Cronobacter sakazaki* são pequenas (1-3mm) com cor azul ou azul esverdeada.

As colônias brancas, brancas com um centro verde, cinza ou preto, assim como as colônias amarelas ou vermelhas, não correspondem ao gênero *Cronobacter*.

ISOLAMENTO EM AGAR NÃO SELETIVO

Espalhar em Agar TSA (K25-1068)

Incubação: 34º-38°C – 21 ± 3h.

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

- Teste de oxidase (-)
- Teste da enzima α-glucosidade
- Caldo Lisina Descarboxilase (K25-1208)
- Meio Ornitina Descarboxilase (K25-2149)
- Meio de Fermentação de Carboidratos
- Vermelho de Metilo (opcional)
- Teste de Voges-Proskauer (opcional)

BIBLIOGRAFIA

Fiedemann M., Enterobacter sakazakii in food and beverage (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 2007; 116:1-10.

ISO 22964:2017. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.

Center of Disease Control and Prevention. Enterobacter sakazakii infections associated with the use of powered infant formula. JAMA, 2002; 287:2204 - 2205.

CONTAGEM PRESUNTIVA DE *BACILLUS CEREUS*

Procedimento definido de acordo com ISO 7932:2004

INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é um bacilo anaeróbio facultativo, gram-positivo e formador de esporos não deformados. É também uma espécie com catalase positiva, fermentadora de glucose e sacarose, e também de salicina e glicerol. Além disso, produz lecitinase que pode ser usada como marcador para estabelecer sua presença.

Esse microrganismo é amplamente distribuído e pode ser encontrado em vários alimentos, principalmente em produtos desidratados, como biscoitos, sopas, cereais e chá. Ele cresce em ampla faixa de temperatura, o que torna essa bactéria muito resistente ao processamento de alimentos. Se adicionarmos a essa característica, a sua capacidade de formar esporos, essas bactérias tornam-se críticas nas análises realizadas na indústria alimentícia.

BIBLIOGRAFIA

MOSSELI, D.A.A. KOOPMAN, M.J, JONGERIUS, E. Enumeration of Bacillus cereus in Foods. 1967. Appli. Micobiol., 1 5; 650-653

ISO 7932:2014. Microbiology of the food chain – Horizontal method for enumeration of presumptive Bacillus cereus. Colony Count technique at 30ºC.

ISO 6887-1:2017. Microbiology of the food chain – Preparation on test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

MÉTODO

SUSPENSÃO INICIAL

Consultar a ISO 6687-1 específica para o produto a ser analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Seletivo Bacillus Cereus (MYP) (K25-1343) e Suplementos Bacillus Cereus (K25-6021) + Emsulsão Gema de Ovo (K25-5152)

Incubação: 30°C // 18 – 48h

CONFIRMAÇÃO

Atividade Hemolítica – Agar Base Sangue nº 2 (K25-1328)

Incubação: 30°C // 24 ± 2 h

As colônias suspeitas de Bacillus cereus apresentam cor rosa e são cercadas por um precipitado.

Se as placas estiverem com muitas colônias e o isolamento não for possível, deve-se realizar uma purificação presuntiva de 5 colônias em Agar Seletivo Bacillus Cereus (MYP) (K25-1343).

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

Procedimento definido de acordo com ISO 21528:2017

INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* é formada por aproximadamente 30 gêneros formados por 100 espécies de bactérias. Esse grupo é caracterizado por bactérias gram-negativas, principalmente com morfologia de bacilos, embora também seja possível encontrar cocos em formas pleomórficas. As enterobactérias pertencem a microbiota intestinal e também podem ser isoladas em outros órgãos humanos, plantas e animais.

A contagem total de enterobactérias é utilizada como indicar de contaminação fecal e boas práticas de fabricação. Por esta razão, esse procedimento indica a qualidade em produtos alimentícios processados. Uma alta contagem desse indicador indica um processo de fabricação deficiente ou uma possível contaminação posterior no produto final, implicando em um risco higiênico-sanitário para o consumidor.

MÉTODO

PRÉ-ENRIQUECIMENTO NÃO SELETIVO

10mL/g de amostra + 90mL de Água Peptona Tamponada (K25-1402)

Incubação: 38 °C – 18 ± 2h

ISOLAMENTO PRESUNTIVO SELETIVO

Agar Bile Vermelho Violeta com Glicose (VRBG) (K25-1092)

Incubação: 37°C – 24 ± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

As colônias suspeitas de *Enterobacteriaceae* apresentam cor rosa avermelhada ou roxa e podem apresentar halos de precipitação.

Se houver mais de uma morfologia de colônia, selecionar uma de cada tipo para isolamento não seletivo na etapa seguinte. Se as colônias esperadas não aparecerem, selecionar aquelas de cor esbranquiçada para confirmação.

ISOLAMENTO EM AGAR NÃO SELETIVO

Agar Nutriente enriquecido com Cloreto de Sódio (NaCl) (K25-1355)

Incubação: 37°C – 24 ± 2h

CONFIRMAÇÃO

Teste de Oxidase (-)

Fermentação de glicose: Tubos com 1cm de Meio de Glicose OF (K25-2150) e a criação de uma atmosfera anaeróbica com óleo mineral estéril (+)

BIBLIOGRAFIA

MOSSELI, D.A.A. Media for Enterobacteriaceae. 1985. Int. J. Food. Micobiol. 2:27-35

ISO 21528-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 1: Detection of Enterobacteriaceae.

iSO 21528-2:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count technique.

CONTAGEM DE *CLOSTRIDUM PERFRINGENS*

Procedimento definido de acordo com ISO 7937:2004

INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é um bacilo gram-positivo e anaeróbio, embora também seja aerotolerante em determinadas situações. Esse bacilo é também um dos patógenos mais amplamente distribuídos na atmosfera graças a sua capacidade de formar esporos, além de ser comumente encontrado na microflora intestinal de humanos e animais.

Essas bactérias podem ser detectadas em uma grande variedade de alimentos crus devido á contaminação do solo ou presença de fezes. Elas podem ser encontradas em carnes cruas, peixes, sopas e molhos desidratados, leite, gelatina, macarrão, farinha, soja, vegetais crus e especiarias.

A intoxicação alimentar causada por *C. perfringens* (devido à liberação de endotoxinas) é geralmente associada com pratos de carne crua, aves, alimentos secos ou pré-cozidos, e menos frequentemente, vegetais. No caso de cepas resistentes ao calor, durante o processo de cozimento, o calor gerado fornece choque térmico para a ativação e germinação de esporos. Além disso, o cozimento diminui o nível de oxigênio, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento de células vegetais.

MÉTODO

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887 e ISO 8261 para o produto em análise.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar TSC (Triptose Sulfito Cicloserina) (K25-1029) + Suplemento Clostridium Perfringens (K25- 6020)

Incubação anaeróbia: 37°C – 20 ± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

Selecionar menos de 150 colônias para a contagem.

CONFIRMAÇÃO

Selecionar uma das técnicas descritas abaixo:

MÉTODO A

Não é necessário purificar as colônias

Meio Tioglicolato (K25-1533)
Incubação anaeróbia:
37°C = 18/24h

Meio Sulfito Lactose (K25-1009)
Incubação anaeróbia:
46°C – 18/24h

MÉTODO B

Exige colônias características bem isoladas, caso contrário, deve-se espalhar colônias características em Meio Tioglicolato (K25-1533)

Meio Nitrato Motilidade (K25-1565)
Incubação anaeróbia: 37°C – 24h

Meio Lactose Gelatina (K25-1526)
Incubação anaeróbia: 46°C – 18/24h

LEITURA DOS RESULTADOS

As colônias com produção de gás e presença de precipitado preto são consideradas positivas.

Colônias sem motilidade, redutoras intensas de nitrato, fermentadoras de lactose e liquefação de gelatina são consideradas positivas.

BIBLIOGRAFIA

ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens – Colony-count technique.

DETECÇÃO E CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULASE* POSITIVA

Procedimento definido de acordo com ISO 6888: 2003

INTRODUÇÃO

Os estafilococos são cocos gram-positivos, catalase positivos, sem motilidade e que crescem em condições de anaerobiose. O gênero *Staphylococcus* possui cerca de 30 espécies, destacando-se entre elas: *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis*.

A espécie mais patogênica entre todas, é a *Staphylococcus aureus*, que geralmente causa infecções na pele, embora também possa causar pneumonia, endocardite e osteomielite. Em geral, elas são associadas à formação de abcessos. Algumas cepas produzem toxinas que causam gastroenterite, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico.

Outra característica que aumenta a patogenicidade do *estafilococos* é a sua capacidade de coagular o sangue devido à produção de coagulase. *S. auereus* coagulase positivo está entre os patógenos mais presentes e perigosos para humanos, tanto por usa virulência quanto por sua capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos.

A onipresença do estafilococos aliada à sua virulência, torna sua detecção em alimentos de grande importância para garantir a segurança dos consumidores.

BIBLIOGRAFIA

ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

ISO 6888-2:1999/2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species).Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.

ISO 6888-3:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species).Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.

MÉTODO

ENUMERAÇÃO: Procedimento definido pela ISO 6888-1

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 específica para o produto analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO PRESUNTIVO

Agar Baird Parker RPF (K25-1100) + Emulsão Telurito Gema de Ovo (K25-5129)
Incubação: 35°C ou 37°C – 24 ± 2h
Reincubação após marcar as colônias características: 35°C ou 37°C – 24 ± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

As colônias características apresentam cor preta, cinza ou branca, são brilhantes e possuem forma convexa, cercadas por um halo de precipitação indicando coagulase positiva.

CONFIRMAÇÃO

Espalhar em Caldo Infusão Cérebro Coração (K25-1331)
Incubação: 35°C ou 37°C – 24 ± 2h
Teste de Coagulase (+)

ENUMERAÇÃO: Procedimento definido de acordo com a ISO 6888-2

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 específica para o produto a ser analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Baird Parker (K25-1319)+ Suplemento RPF (K25-6024)
Incubação: 37°C – 35°C - 24 ± 2h
Reincubação após marcar as colônias características:
35 °C ou 37°C – 24 ± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

As colônias características apresentam cor preta, cinza ou branca, cercadas por um halo de precipitação indicando coagulase positiva.

CONFIRMAÇÃO

Não é necessário, pois a atividade é detectada com RPF.

DETECÇÃO E NMP. Procedimento de acordo com a ISO 6888-3

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887 ou 8261 para o produto a ser analisado.

ENRIQUECIMENTO

0,1mL de suspensão inicial + 9mL de Caldo Giolitti-Cantoni (K25-1287)

Incubação: 37°C – 24 ± 2h

ENRIQUECIMENTO

10mL de suspensão inicial + 10mL de Caldo Giolitti-Cantoni em dupla concentração (K25-1287)

Incubação: 37°C – 24 ± 2h

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Baird Parker (K25-1100) + Emulsão Telurito Gema de Ovo (K25-5129) ou Agar Base Baird Parker (K25-1319) + Suplemento RPF (K25-6024)

Incubação: 37°C – 24 ± 2h e 48 ± 2h

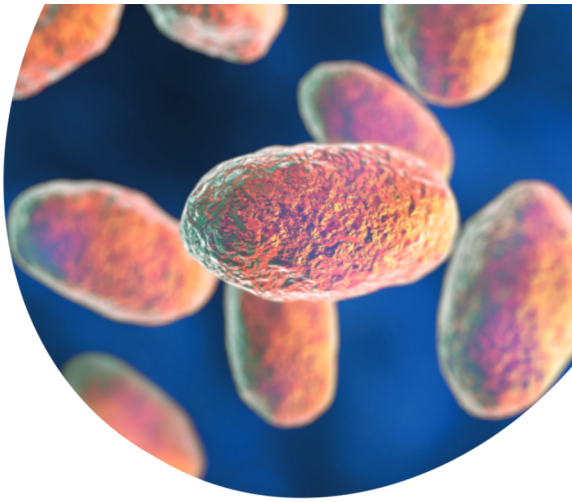
CONFIRMAÇÃO

O método Baird Parker é utilizado somente para contagem:

Espalhar em Caldo Infusão Cérebro Coração (K25-1331)
Incubação: 35°C ou 37°C – 24 ± 2h
Teste de Coagulase (+)

DETECÇÃO DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PATOGÊNICA

Procedimento definido de acordo com ISO 10273:2017



INTRODUÇÃO

A Yersinia *enterocolitica* é uma bactéria gram-negativa, oxidase-negativa, anaeróbica facultativa e não forma esporos. Esse tipo de bactéria possui a capacidade de crescimento em ampla faixa de temperatura (de 1°C a 40 °C) e apresenta cápsula com fatores anti-fagocitários que aumenta sua patogenicidade.

A sua capacidade de se multiplicar em alimentos a baixas temperaturas, assim como em produtos embalados à vácuo, é a principal razão para a *Yersina enterocolitica* ser uma grande preocupação dentro da indústria alimentícia. A maioria das detecções estão associadas ao consumo de carne, leite e laticínios não pasteurizados.

Embora existam muitos alimentos de origem animal que podem ser portadores de *Y. enterocolitica*, o gado suíno é infectado mais do que qualquer outra espécie animal.

MÉTODO

ENRIQUECIMENTO SELETIVO PRIMÁRIO

XmL/g de amostra + 9x mL de Caldo Peptona Sorbitol e Sais Biliares (PSB) (K25-1298)

Incubação: 25 °C ± 1°C – 44 ± 4h

ENRIQUECIMENTO SELETIVO SECUNDÁRIO

10 mL de suspensão inicial em Caldo PSB + 90mL de Caldo Glutamato Modificado de Minerais MMBG + Suplemento ITC (K25-1365 + K25-6051)

Incubação: 25 °C ± 1°C – 44 ± 4h

Tratamento alcalino (4,5mL de KOH) durante 20 ± 5S.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Base Seletivo Yersinia (CIN) + Suplemento Seletivo Yersinia (CIN) (K25-1126 + K25-6033)
Incubação: 30°C ± 1°C – 24 ± 2h

LEITURA DOS RESULTADOS

As colônias características são pequenas e circulares. Apresentam uma zona central com borda vermelha escura bem definida. Ao redor delas, é possível observar uma aérea translúcida ou transparente.

DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS

- Teste de urease (+)
- Agar Bile Esculina (-) (K25-1031)
- Plasmídeo pYV (+)
- Detecção de pirazinamidase (-)

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

- Caldo Lisina Descarboxilase (-): K25-1208
- Arginina dihidrolase (-)
- Agar Fenilalalamina (K25-1040)
- Fermentação de carboidratos:
  Sacarose (+)
  Sorbitol (+)
  Ramnosa (-)
  Melibiose (-)
- Agar Citrato Simmons (-): K25-1014

BIBLIOGRAFIA

TENNANT S.H, GRANT T.H and ROBINS-BROWNE R.M. Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype 1A.FEMS Inmun. Medical Microbiol. 2003, 38 pp 127-137.

BOTTONE E.J, Yersinia enterocolitica. Overview and epidemiologic correlates. Microbes Infetc. 1999, 1 (4) pp. 323-333.

ISO 10273:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of pathogenic Yersinia enterocolitic

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *SHIGELLA* SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 21567:2004

INTRODUÇÃO

Shigella é um gênero de bacilo sem motilidade, gram-negativo, não esporulado, anaeróbico facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Apresenta atividade bioquímica reduzida com atividade negativa de citocromo-oxidase e fermentação de glicose sem gás.

É uma bactéria altamente entero invasiva: seu habitat principal é o cólon de seres humanos, embora também tenha sido isolada em primatas superiores. As espécies de *Shigella* são muito sensíveis a mudanças de temperatura e condições ambientais desfavoráveis. No entanto, elas são capazes de tolerar pH baixo, portanto, são uma das poucas bactérias que podem sobreviver à acidez do estômago e colonizar o trato digestivo. Essa habilidade, combinada com o fato que essas bactérias são infeciosas em doses baixas, contribui para sua patogenicidade.

A contaminação de alimentos com *Shigella* pode ser resultado do contato direto e indireto com matéria fecal proveniente de pessoas infectadas, através de água infectada, pragas (moscas) ou falta de higiene e técnicas adequadas de manuseio durante a preparação dos alimentos.

MÉTODO

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

X mL/g + 9X mL de Caldo Shigella (K25-2078)
Incubação em anaerobiose: 41,5 ± 1°C – 16/20 h

1 ISOLAMENTO SELETIVO (SELETIVIDADE BAIXA)

Agar MacConkey (K25-1052)
Incubação: 37 ± 1°C – 20/24h

2 ISOLAMENTO SELETIVO (SELETIVIDADE MÉDIA)

Agar XLD (Xilose Lisina Desocixolato) (K25-1274)
Incubação: 37 ± 1°C – 20/24h

3 ISOLAMENTO SELETIVO (SELETIVIDADE ALTA)

Agar Hektoen Entérico (K25-1030)
Incubação: 37 ± 1°C – 20/24h

LEITURA DOS RESULTADOS

Para identificar colônias caraterísticas de Shigella, consultar as instruções de uso dos meio de cultura.

PURIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS

Espalhar em Agar Nutriente (K25-1060)
Incubação: 37 ± 1°C – 20/24h

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

- Agar TSI(Triplo Açúcar Ferro)(K25-1172)
- Agar Nutriente Semisólido (-): K25-2046
- Meio Descarboxilase L-Lisina (-): (K25-1176)
- Descarboxilação da L-ornitina (+/- de acordo com a espécie)
- Caldo Cultura Triptofano (+/- de acordo com a espécie): K25-1237
- Detecção de β-galactosidade (+/- de acordo com a espécie)
- Fermentação de açúcar (de acordo com a espécie)
- Acetato diferencial K25-1192

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

- Diferenciação antigênica
- Testes de aglutinação

BIBLIOGRAFIA

PASCUAL ANDERSON, Mª R. (1992) Microbiología Alimentaria. Díaz de Santos, S.A. Madrid.

ATLAS, R.M., L.C. PARK (1993) Handbook of Microbiological Mediafor the examination of Food. CRC Press Inc.Boca Ratón.

ISO 21567:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Shigella spp.

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO *ESCHERICHIA COLI*

Procedimento definido de acordo com ISO 7251: 2005 / ISO 16649:2015

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo, móvel e não esporulento pertencente à família *Enterobacteriaceae.* Apresenta atividade bioquímica reduzida com atividade negativa de citocromo-oxidase e fermentação de glicose sem gás. Além disso, é uma bactéria lactose positiva e oxidase negativa.

A *Escherichia coli* pode ser diferenciada de outros coliformes através da sua habilidade em produzir indol a partir de triptofano ou devido a sua produção da enzima β-glucuronidase. Essas características são utilizadas para isolamento seletivo e confirmação de diferentes processos analíticos descritos a seguir.

Além disso, essas bactérias são encontradas no intestino de humanos e animais de sangue quente. Devido à sua alta presença no trato intestinal e fezes, são considerados microrganismos marcadores de práticas de higiene inadequadas ou contaminação por fezes durante o manuseio de alimentos.

BIBLIOGRAFIA

ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli. Most probable number technique.

ISO 16649-1:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucoronidase-positive Escherichia coli. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucoronide.

ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucoronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucoronide.

ISO 16649-3:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucoronidase-positive Escherichia coli. Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucoronide.

MÉTODO

1. Procedimento definido pela ISO 7251: 2005
Detecção e enumeração via Número Mais Provável (NMP):

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887 ou 8261 padrão para o produto em análise.

PRÉ-ENRIQUECIMENTO

1mL de suspensão inicial + 9mL de Caldo Lauril Sulfato (K25-1310) e 10mL de suspensão inicial + 90mL de Caldo Lauril Sulfato duplamente concentrado.
Incubação: 37°C – 24 ± 2h

ISOLAMENTO SELETIVO

Meio EC (K25-1522)
Incubação: 44°C – 24/48 ± 2h

PRODUÇÃO DE INDOL

Inocular tubos com Água Peptonada (Água Triptona) (K25-1403) após incubação do meio seletivo
Incubação: 44°C – 48 ± 2h

LEITURA DOS RESULTADOS

O crescimento revelado pela turbidez e a existência de gás no meio EC e cor vermelha na produção de indol revela a presença de *E. coli.*

NOTA 1: Para enumeração utilizando método NMP (Número Mais Provável), utilizar 3 tubos para diluição. Em alguns casos, de acordo com a matriz, são necessários 5 tubos (consulte a norma pertinente).

2. Procedimento definido pela ISO 16649-1:2001
Contagem de colônias a 44°C utilizando membranas

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 padrão ou padrão relevante para o produto em análise.

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Em uma membrana em placas de Agar MMG, adicionar 1mL de suspensão inicial.
Secar por 15 minutos em temperatura ambiente.
Incubação: 37°C – 4 ± 1h

ISOLAMENTO SELETIVO

Transferir a membrana para o Agar Cromogênico TBX (Triptona Bile X-Glucuroneto) (K25-1151)
Incubação: 44°C – 18/24 h

3. Procedimento definido pela ISO 16649-2:2001
Contagem de colônias a 44 °C

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 padrão ou padrão relevante para o produto em análise.

ISOLAMENTO SELETIVO

Agar Cromogênico TBX (Triptona Bile X-Glucuroneto) (K25-1151)
Incubação: 44°C – 18/24h

NOTA 2: O técnico deve decidir entre a ISO 16649-1 e 16649-2, tendo em mente que o primeiro método é desenvolvido para quando a amostra possui células com alto índice de estresse.

4. Procedimento definido pela ISO 16649-3:2015
Detecção e contagem através da técnica NMP

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 padrão ou padrão relevante para o produto em análise.

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

Adicionar uma proporção de amostra/suspensão inicial em Caldo Glutamato Modificado de Minerais (MMG) (K25-1365) em concentrações simples (1:9) e dupla (1:1).
Incubação: 37°C ± 1°C – 24h±2h

ISOLAMENTO SELETIVO

Espalhar em Agar Cromogênico TBX (Triptona Bile X-Glucuroneto) (K25-1151)
Incubação: 44°C – 22 ± 2 h

NOTA 3: Para contagem de acordo com o método NMP (Número Mais Provável), utilizar 3 tubos para cada diluição, os quais serão usados posteriormente para a técnica NMP. Em alguns casos, de acordo com a matriz, são necessários 5 tubos (consultar a norma pertinente).

CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS

Procedimento definido de acordo com ISO 4832:2006

INTRODUÇÃO

Os coliformes totais são enterobactérias positivas para lactose e constituem um grupo que é definido mais pelos testes utilizados para seu isolamento do que pelos critérios taxonômicos. Elas pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são caracterizadas por sua habilidade em fermentar lactose com gás e produção de ácido, de forma relativamente rápida, em um período de 48 horas e com temperatura de incubação entre 30 a 37 °C.

Essas bactérias são bacilos não esporulentos, gram-negativos, aeróbicos facultativos e anaeróbicos. O grupo "coliformes", é formado por vários gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Elas são encontradas no intestino de seres humanos e animais, assim como em outros ambientes como água, solo, plantas, cascas de ovos etc.

Visto que é difícil distinguir entre coliformes existentes e novas contaminações, admite-se que todas as aparições de coliformes são novas contaminações, a menos que se prove o contrário.

MÉTODO

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a ISO 6887-1 ou 8261 relevante para o produto em análise.

ENRIQUECIMENTO SELETIVO

1mL de suspensão inicial em Agar Bile Vermelho Violeta Lactose (VRBL) (K25-1093)
Incubação: 30/37 °C – 24 ± 2h

LEITURA DE RESULTADOS

Selecionar placas com menos de 150 UFC para enumeração. As colônias características apresentam cor roxa, ocasionalmente cercadas por um halo avermelhado de precipitação.

CONFIRMAÇÃO

Para colônias atípicas, inocular em Agar Bile Verde Brilhante 2% (K25-1228)
Incubação: 30°/37 °C – 24 ± 2h

BIBLIOGRAFIA

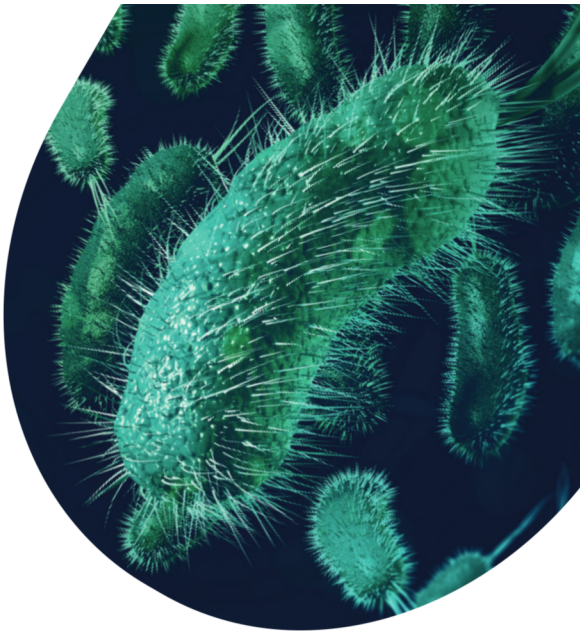
COWELL and MORISETTI. J. Sci. Food Agric. 20, 1969, pp. 573

ISO 48321:2006. Microbiology of food and animal feeding – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique

ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.

DETECÇÃO DE ESCHERICHIA COLI O157

Procedimento definido de acordo com ISO 16654:2001



INTRODUÇÃO

O sorotipo O157 de *Escherichia coli* é gram-negativo e possui forma de bastonete. O "O" do nome se refere ao antígeno presente na parede celular (antígeno somático) que essas bactérias apresentam. É uma cepa entero hemorrágica e causa intoxicação alimentar devido a produção de uma enterotoxina citotóxica, chamada verotoxina.

A maior incidência da doença tem sido associada ao consumo de carne moida mal cozida. Contato interpessoal dentro da família e em escolas maternais é também uma rota significativa de transmissão. A infecção também ocorre após o consumo de leite não pasteurizado e após nadar em ou beber água contaminada pelo contato com excrementos de animais, água fecal ou esgoto.

MÉTODO

ENRIQUECIMENTO

X g/mL + 9x mL de Caldo de Soja Tripticaseína Modificado com Novobiocin (mTSB) (K25-1292)
Homogeneizar e incubar por 6h e em seguida incubar a 41,5°C – 12/18h

SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA

Por 6 horas ou mais, após 12/18h de incubação

ISOLAMENTO SELETIVO

50µL de partículas magnéticas ressuspendidas em Agar MacConkey com Sorbitol (CT-SMAC) + SuplementoTelurito Cefixime (CT) (K25-1099 + K25-6064)
Incubação: 37°C - 18/24h

ISOLAMENTO SELETIVO

50µL de partículas magnéticas ressuspendidas em Agar Cromogênico *E.Coli* O157:H7 (K25-1588 + K25-6064)
Incubação: 37°C - 18/24h

PURIFICAÇÃO DE COLÔNIAS

Espalhar em Agar Nutriente (K25-1060)
Incubação: 37°C - 18/24h

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

Meio Cultura Triptofano (K25-1237) + Reagente Kovac's (K25-5205)

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA

Apenas para as colônias indol positivas

BIBLIOGRAFIA

ZADIK P.M, CHAPMAN P.A and SIDDONS C.A. J. Med. Microbiol., 39, 1993, pp. 155-158

DOYLE M.P. and SCHOENI J.L. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1987, pp 2394-2396

ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157

DETECÇÃO DE VIBRIO SPP

Procedimento definido de acordo com ISO 21872:2007

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Vibrio* são bacilos gram-negativos com células em formato de vírgula. *Vibrio* é oxidase positivo, anaeróbico facultativo e não forma esporos. Todas as espécies do gênero são móveis, geralmente com um flagelo polar único.

Várias espécies de *Vibrio* são patogênicas e causam doenças no trato digestivo, especialmente *V. cholerae*, o agente causador da cólera; *V. parahaemolyticus*, causa diarreia inflamatória autolimitada, e *V. vulnificus*, transmitido pela ingestão de mariscos.

A infecção por *vibrio* ocorre geralmente, através do consumo de mariscos crus ou malcozidos. Essas bactérias crescem naturalmente em ambientes marinhos, seja em água salgada ou estuários, onde há uma mistura de água doce ou salgada. Essa presença aquática torna os produtos de pesca, os alimentos mais relacionados com espécies do gênero Vibrio.

MÉTODO

ENRIQUECIMENTO PRIMÁRIO

25 g/mL + 225mL de Água Peptona Tamponada (K25-1402)
Incubação (produto fresco): 41,5°C ± 1 – 6 ± 1h
Incubação (outros): 37°C ± 1 – 6 ± 1h

ENRIQUECIMENTO SECUNDÁRIO

1mL de amostra + 10 mL Água Peptona Tamponada (K25-1402)
Incubação (*V.cholerae, V.parahaemolyticus*): 41,5°C ± 1 – 6 ± 1h
Incubação (*V. vulnificus*): 37°C ± 1 – 6 ±1h

ISOLAMENTO SELETIVO

1 µl de cultura incubada em Agar TCBS (K25-1074)
Incubação: 37°C ± 1 – 24h ± 3h

A norma também inclui um segundo meio seletivo a ser selecionado pelo laboratório.

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

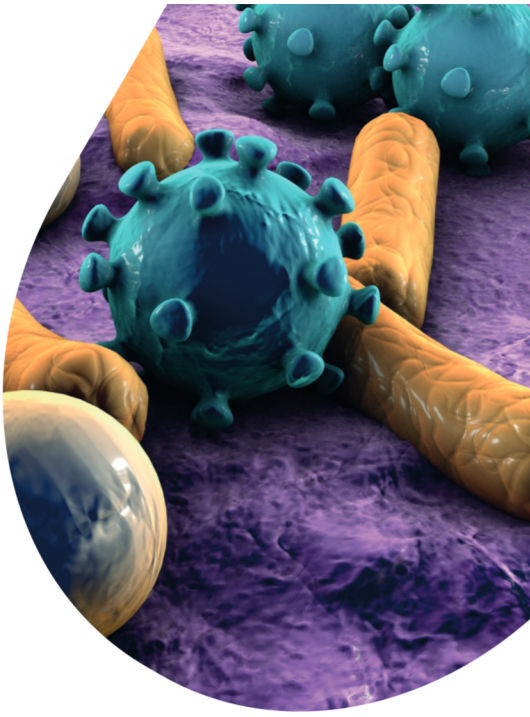
- L-Lisina descarboxilase em meio salino
- Arginina di-hidrolase em meio salino
- Detecção de β-galactosidase
- Detecção indol
- Halotolerância

Para leitura de resultados, verificar a norma referente.

BIBLIOGRAFIA

ISO 21872-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the Vibrio spp. – Part 1: Detection of patoentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus.

DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE OUTROS MICRORGANISMOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS



Contagem de bactérias redutoras de sulfito em condições anaeróbias (ISO 15213: 2003)

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar as normas ISO 6887 ou 8261 padrão relevantes de acordo com o produto a ser analisado (proporção 1:9)

ISOLAMENTO SELETIVO

1mL de diluição inicial Agar Sulfito de Ferro (K25-1559)
Incubação para bactérias termófilicas: 50°C ± 1 – 24/48 h
Incubação para bactérias mesofílicas: 37°C ± 1 – 24/48 h

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

- Teste de Aerotolerância
- Teste de Esporulação

Contagem de bactérias lácteas (ISO 15214: 1998)

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a norma 6887-1 específico para o produto a ser analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO

1mL de diluição em Agar MRS pH baixo (K25-1433)
Incubação para bactérias: 30°C – 72h ± 3h

BIBLIOGRAFIA

ISO 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.

ISO 13720:2010. Meat and meat products. Enumeration of presumptive Pseudomonas spp.

ISO 6611:2004//IDF 94. Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeast and/or molds – Colony-count technique at 25 ºC.

Contagem de fungos e leveduras em lacticínios (ISO 6611: 2004)

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar a norma 8261 relevante de acordo com o produto a ser analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO

1mL de diluição inicial em Agar OGA (Ágar Glicose Oxitetraciclina) (OGYE) + Suplemento OGA (K25-1527 + K25-6018)
Incubação para bactérias: 25°C ± 1 – 5 dias

A norma também inclui o meio Agar Cloranfenicol (Agar YGC) (K25-1301) como meio para isolamento seletivo.

***Pseudomonas* spp (suspeitas) em carne e produtos derivados de carne (ISO 13720:2010)**

SUSPENÇÃO INICIAL

Consultar as normas ISO 6887 ou 8261 relevantes de acordo com o produto a ser analisado.

ISOLAMENTO SELETIVO

0,1mL de diluição inicial em Agar CFC Pseudomonas + Suplemento CFC
(K25-1356 + K25-6036)
Incubação para bactérias: 25°C ± 1 – 44 h ± 4h

CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

- Teste de Oxidase (+)