



DA COZINHA AO PRATO: ANÁLISE MICROBIANA

Claudia Sofia Machado

Unidade de Observação e Vigilância
Departamento de Alimentação e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP

E-mail: claudia.machado@insa.min-saude.pt

ÍNDICE

- Objectivos
- Unidade de Referência – Laboratório de Microbiologia
- Fontes de Contaminação
- A Prevenção
- O Laboratório
- Microrganismos
- Considerações Finais



OBJECTIVOS GERAIS

- Demonstrar os conhecimentos adquiridos na Unidade de Referência sobre a rotina do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (URMI)
- Expor os conhecimentos adquiridos sobre o controlo da restauração colectiva



OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir conhecimentos para elaborar os critérios de validação e de qualidade de dados microbianos para aceitação na Base de Dados do Portal PortFIR
- Obter conhecimentos para realizar análise de risco em segurança alimentar





SEGURANÇA ALIMENTAR QUEM?

5



UNIDADE DE REFERÊNCIA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

6

Departamento de
Alimentação e Nutrição

Estruturas de Suporte
Gestão da Qualidade

Unidade de I&D
(DAN UID)

Unidade de
Observação e
Vigilância
(DAN UOV)

Unidade de
Referência
(DAN UR)

Laboratório de Química
(URQ Lisboa e Porto)

Laboratório de
Microbiologia
(URMI Lisboa e Porto)

Laboratório de Materiais
de Referência
(URMR)



URMI

- Laboratório Integrante do Departamento de Alimentação e Nutrição
- Laboratório de Referência
- Laboratório com Métodos Acreditados pela IPAC (NP EN ISO/IEC 17025)
- Laboratório com técnicos com qualificação superior



URMI

- Gestor do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em colaboração com a Health Protection Agency
- Apoiante Técnico-Normativo à rede de Laboratórios de Saúde Pública
- Investigador
- Formador
- Prestador de Serviços



URMI

- Gestor do PNAEQ
- Participante do PNAEQ
 - Standard Scheme
 - Extended Scheme



DEPARTAMENTO DE ALIMENTAÇÃO
E NUTRIÇÃO

LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA
(Lisboa e Porto)

Programa Nacional de
Avaliação Externa da Qualidade
em Microbiologia de Alimentos

9ª Reunião Nacional

15 de Outubro de 2010

Ante-fóreato do Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Lisboa

FOOD EQA Schemes



URMI



○ Objectivo?

- Melhorar a performance do laboratório
- Comparar o estado da arte a nível nacional
- Aumentar o nível da qualidade laboratorial
- Permitir o cálculo do erro total admissível
- Aumentar o nível técnico

○ Porquê?

- Exigência das normas de acreditação NP EN ISO/IEC 17025

DEPARTAMENTO DE ALIMENTAÇÃO
E NUTRIÇÃO

LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA
(Lisboa e Porto)

Programa Nacional de
Avaliação Externa da Qualidade
em Microbiologia de Alimentos

9ª Reunião Nacional

15 de Outubro de 2010

Ante-fórum do Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Lisboa

FOOD EQA Schemes



URMI

- Gestor do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em colaboração com a Health Protection Agency
- **Apoiante Técnico-Normativo à rede de Laboratórios de Saúde Pública**
- Investigador
- Formador
- Prestador de Serviços



URMI

- Gestor do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em colaboração com a Health Protection Agency
- Apoiante Técnico-Normativo à rede de Laboratórios de Saúde Pública
- **Investigador**
- Formador
- Prestador de Serviços



URMI

- “Análise microbiológica de saladas minimamente processadas, compostas exclusivamente de folhas *Baby Leaf*, prontas a consumir”
- “Avaliação microbiológica de produtos destinados à alimentação infantil disponíveis no mercado português”



URMI

- Gestor do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em colaboração com a Health Protection Agency
- Apoiante Técnico-Normativo à rede de Laboratórios de Saúde Pública
- Investigador
- **Formador**
- Prestador de Serviços



URMI

- Conferências Científicas
- Estágios
- Visitas de Estudo



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

Departamento de Alimentação e Nutrição
Unidade de Referência
Laboratórios de Microbiologia

Vigilância em Restauração Colectiva



22 de Novembro de 2010

Anfiteatro do Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, I.P.
Lisboa

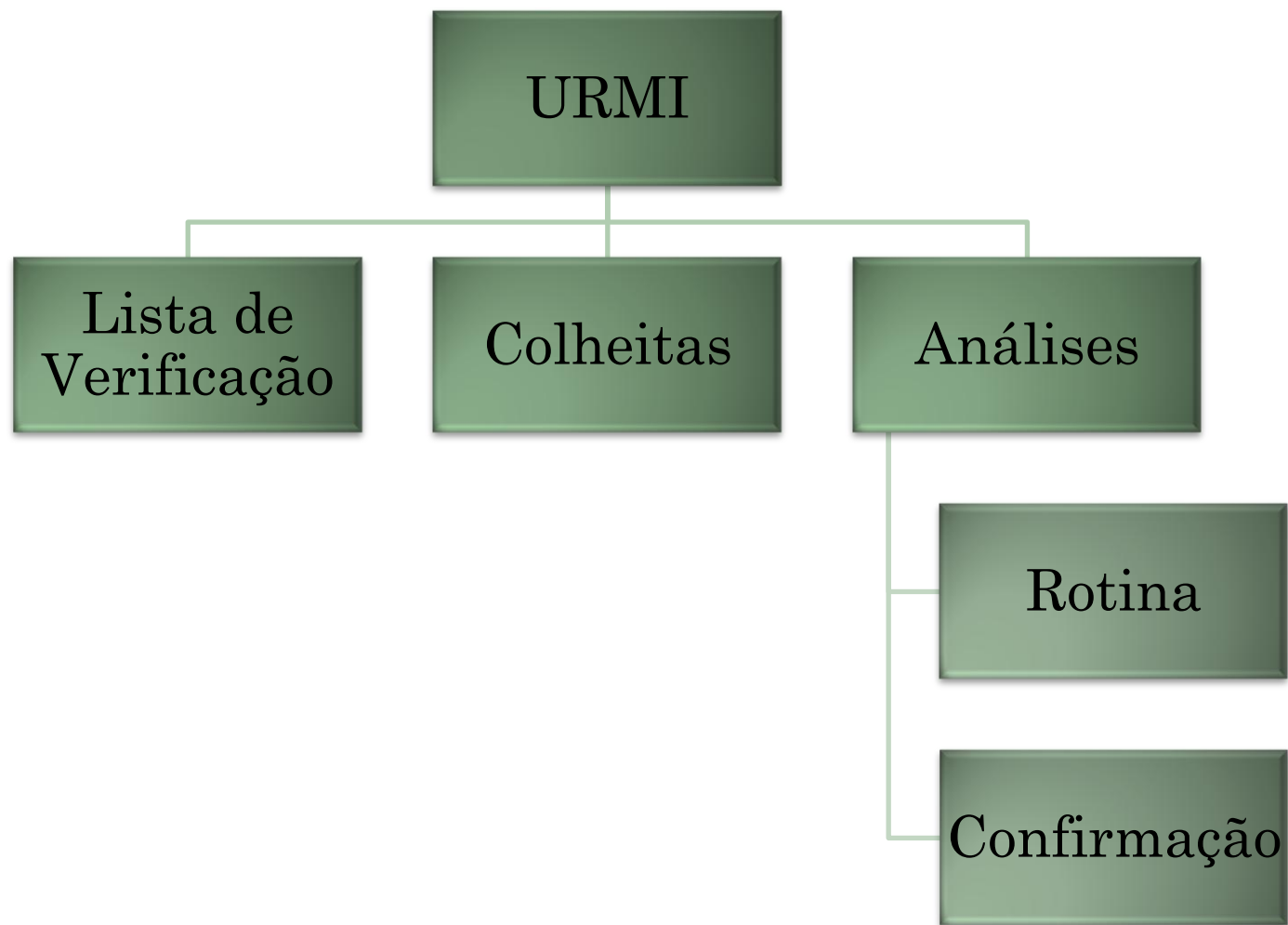


URMI

- Gestor do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) em colaboração com a Health Protection Agency
- Apoiante Técnico-Normativo à rede de Laboratórios de Saúde Pública
- Investigador
- Formador
- Prestador de Serviços



URMI





19

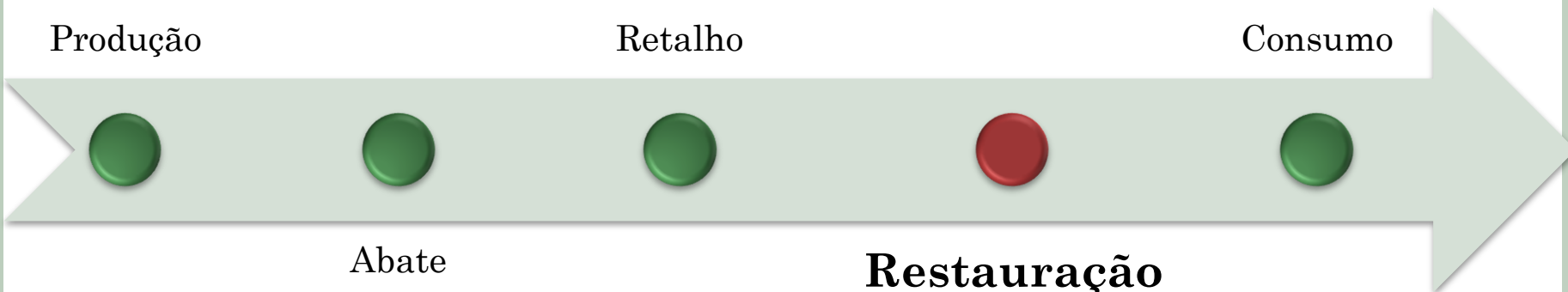
INÍCIO DA VIAGEM...

CADEIA DE RISCO

Exploração
/
Produção

Distribuição
/
Retalho

Consumo



Abate
/
Processamento

**Restauração
Colectiva**



FONTES DE CONTAMINAÇÃO



Bacillus cereus



Listeria



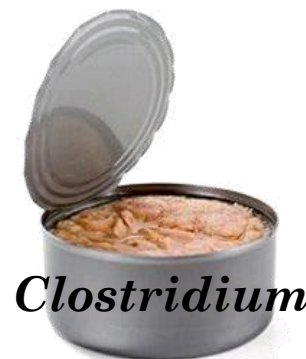
Salmonella



Bolores



Campylobacter



Clostridium



Vibrio

FONTES DE CONTAMINAÇÃO

- Matérias-primas contaminadas



- Processamento inadequado

- Más práticas na distribuição



- Armazenagens impróprias



FONTES DE CONTAMINAÇÃO

- Manipulações inadequadas
- Confeccções inadequadas
- Pessoal manipulador infectado
- Má higiene pessoal, das instalações, equipamentos e utensílios



A PREVENÇÃO



A PREVENÇÃO

○ Lista de Verificação:

- Pretende rastrear a correcta aplicação dos Pré-Requisitos do HACCP
- Garante a harmonização da avaliação que é efectuada nas diversas unidades de restauração colectiva
- Permite a elaboração de relatórios técnicos
- Baseada no Regulamento CE 852/2004 e no *Codex Alimentarius*



NA PREVENÇÃO DA TOXINFECCÃO



○ Lista de Verificação:

- 50 Questões
 - Formação, Saúde e Higiene Pessoal
 - Instalações e Equipamentos
 - Refrigeração / Congelação
 - Confeção e Distribuição de Refeições
 - Boas Práticas



A PREVENÇÃO

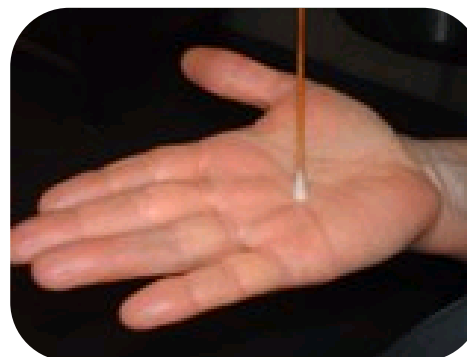
- Lista de Verificação – Problemas Frequentes:
 - Marcha em frente não verificada
 - Não separação dos alimentos armazenados
 - Mau estado dos equipamentos
 - Falta de equipamento que permita armazenamento dos alimentos nas diversas etapas a temperaturas adequadas
 - Descongelação de alimentos fora do frigorífico
 - Chão em mau estado/ausência de junções arredondadas entre chão-parede



A PREVENÇÃO

○ Colheitas e Análise:

- Amostra de alimento
- Esfregação de loiça, superfície ou mãos dos operadores



A PREVENÇÃO

- Características da amostra?
 - Representativa
 - Preservar as características microbianas

- Como escolher?
 - Avaliação *on site*



A PREVENÇÃO

- Cuidados a ter antes da colheita?
 - Técnico devidamente equipado, respeitando as regras de assepsia
 - Preencher a ficha de identificação da colheita (DAN URMI-IM01 L)

REGISTO DA COLHEITA DE AMOSTRAS NO LOCAL

Requisitante:				
Local da Colheita:				
Ponto de Colheita:				
Proveniência:				
Nº amostra	Descrição da Amostra	Grupo	Parâmetros	Hora da colheita

Responsável da Unidade visitada: _____



A PREVENÇÃO

REGISTO DA COLHEITA DE AMOSTRAS NO LOCAL

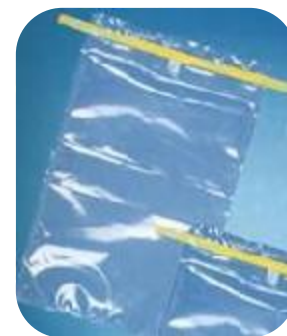
Requisitante:				
Local da Colheita:				
Ponto de Colheita:				
Proveniência:				
Nº amostra	Descrição da Amostra	Grupo	Parâmetros	Hora da colheita

Responsável da Unidade visitada:



A PREVENÇÃO

- Cuidados a ter durante a colheita?
 - Ambiente limpo, calmo e sem correntes de ar
 - Sem objectos na proximidade que possam interferir com os componentes do alimento
 - Próximo a uma chama
 - À temperatura de conservação do alimento
 - Utensílios de colheita devidamente selados e estéreis
 - Utensílios de colheita devem apenas contactar com a amostra a recolher



A PREVENÇÃO

○ Cuidados a ter após a colheita?

- Transporte em mala isotérmica autorefrigerada (0-4°C)
- Transporte curto período de tempo (máximo 4h)
- Análise deve ser efectuada até a colheita perfazer as 24h



A PREVENÇÃO



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra



O LABORATÓRIO

Diário da
República

2ª Série

Nº 10

10 de
Maio 2010

M1

Microrganismos a 30°C, contagem (ISO 4833/TEMPO bioMérieux)
Enterobacteriaceae, contagem (ISO 21528-2 /TEMPO bioMérieux)
Escherichia coli, contagem (ISO 16649-2/TEMPO bioMérieux)
Clostridium perfringens a 37°C, contagem (ISO 7937)
Bacillus cereus, contagem (ISO 7932/ Método interno)
Estafilococos coagulase positiva, contagem (ISO 6888-1/TEMPO bioMérieux)
Listeria spp., contagem (ISO 11290-2)
Listeria monocytogenes, pesquisa (VIDAS bioMérieux)
Salmonella spp, pesquisa (VIDAS bioMérieux)

M2

Microrganismos a 30°C, contagem (ISO 4833/TEMPO bioMérieux)
Bolores a 25°C, contagem (NF V08-059)
Leveduras a 25°C, contagem (NF V08-059)
Enterobacteriaceae, contagem (ISO 21528-2 /TEMPO bioMérieux)
Escherichia coli, contagem (ISO 16649-2/TEMPO bioMérieux)
Clostridium perfringens a 37°C, contagem (SO 7937)
Bacillus cereus, contagem (ISO 7932/ Método interno)
Estafilococos coagulase positiva, contagem (ISO 6888-1/TEMPO bioMérieux)
Listeria spp., contagem (ISO 11290-2)
Listeria monocytogenes, pesquisa (VIDAS bioMérieux)
Salmonella spp, pesquisa (VIDAS bioMérieux)

M3

Microrganismos a 30°C, contagem (ISO 4833/TEMPO bioMérieux)
Bactérias lácticas mesófilas, contagem (ISO 15214)
Microrganismos não lácticos a 30°C, contagem (Método interno)
Bolores a 25°C, contagem (NF V08-059)
Leveduras a 25°C, contagem (NF V08-059)
Enterobacteriaceae, contagem (ISO 21528-2 /TEMPO bioMérieux)
Escherichia coli, contagem (ISO 16649-2/TEMPO bioMérieux)
Clostridium perfringens a 37°C, contagem (ISO 7937)
Bacillus cereus, contagem (ISO 7932/ Método interno)
Estafilococos coagulase positiva, contagem (ISO 6888-1/TEMPO bioMérieux)
Listeria spp., contagem (ISO 11290-2)
Listeria monocytogenes, pesquisa (VIDAS bioMérieux)
Salmonella spp, pesquisa (VIDAS bioMérieux)



O LABORATÓRIO

○ Pesquisa

- Mediante a Norma
- Método Imunoenzimático (Vidas)

○ Contagens

- Mediante a Norma
- Método mais abrangente



O LABORATÓRIO

Toxinfecções

- Infecção Alimentar / Intoxicação Alimentar
- Elaboração do análises personalizadas
 - Características do alimento
 - Características dos sintomas do surto
 - Período de incubação / Início dos sintomas
 - Tempo de duração dos sintomas



O LABORATÓRIO

Toxinfecções

Etiologic agent	Incubation period	Clinical syndrome	Confirmation
Bacterial			
1. <i>Bacillus cereus</i>			
a. Vomiting toxin	1–6 hrs	Vomiting; some patients with diarrhea; fever uncommon	Isolation of organism from stool of two or more ill persons and not from stool of control patients OR Isolation of 10^5 organisms/g from epidemiologically implicated food, provided specimen is properly handled
b. Diarrheal toxin	6–24 hrs	Diarrhea, abdominal cramps, and vomiting in some patients; fever uncommon	Isolation of organism from stool of two or more ill persons and not from stool of control patients OR Isolation of 10^5 organisms/g from epidemiologically implicated food, provided specimen is properly handled
2. <i>Brucella</i>	Several days to several months; usually >30 days	Weakness, fever, headache, sweats, chills, arthralgia, weight loss, and splenomegaly	Two or more ill persons and isolation of organism in culture of blood or bone marrow; greater than fourfold increase in standard agglutination titer (SAT) over several weeks, or single SAT 1:160 in person who has compatible clinical symptoms and history of exposure
3. <i>Campylobacter jejuni/coli</i>	2–10 days; usually 2–5 days	Diarrhea (often bloody), abdominal pain, and fever	Isolation of organism from clinical specimens from two or more ill persons OR



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra



O LABORATÓRIO

Recepção



Identificação



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra

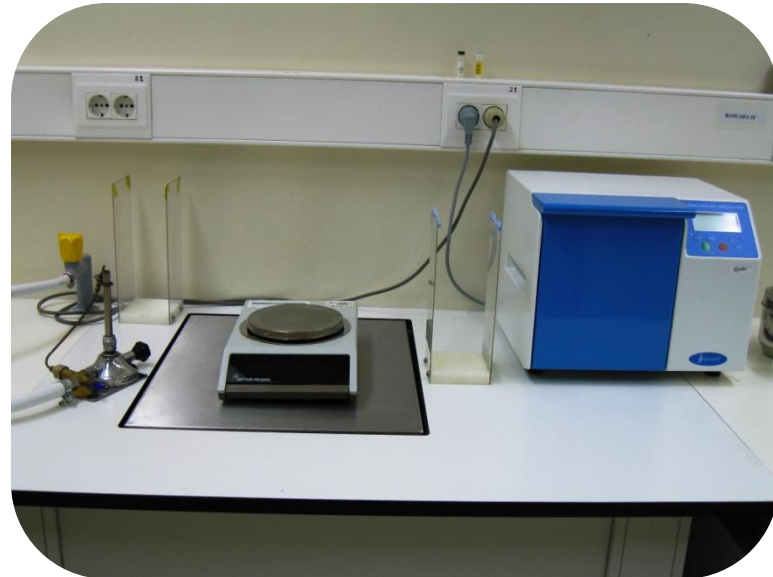


O LABORATÓRIO

Pesagem e Diluição
Automática da Amostra



Pesagem e Diluição
Manual da Amostra



O LABORATÓRIO

Pesagem e Diluição Automática da Amostra



Pesagem e Diluição Manual da Amostra

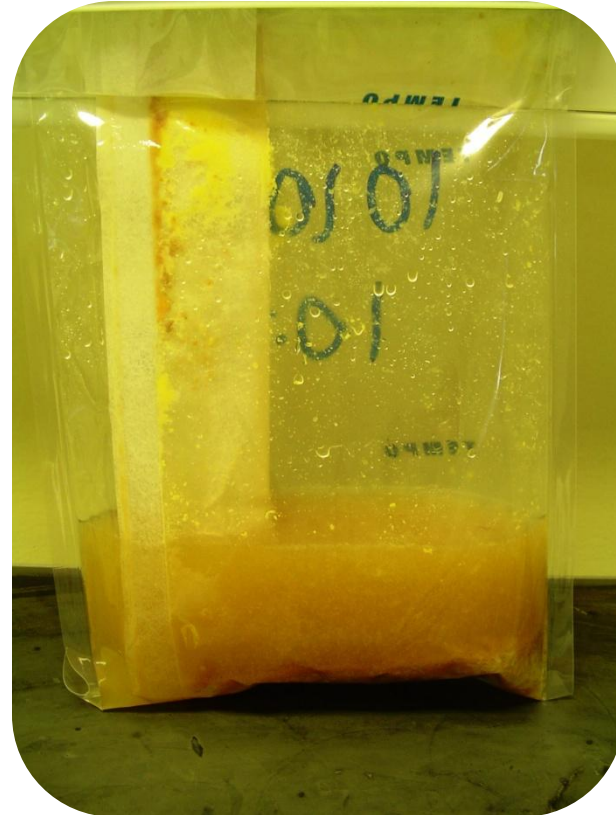


O LABORATÓRIO

Antes “Stomacher”



Depois “Stomacher”



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra



O LABORATÓRIO

Diluição Manual

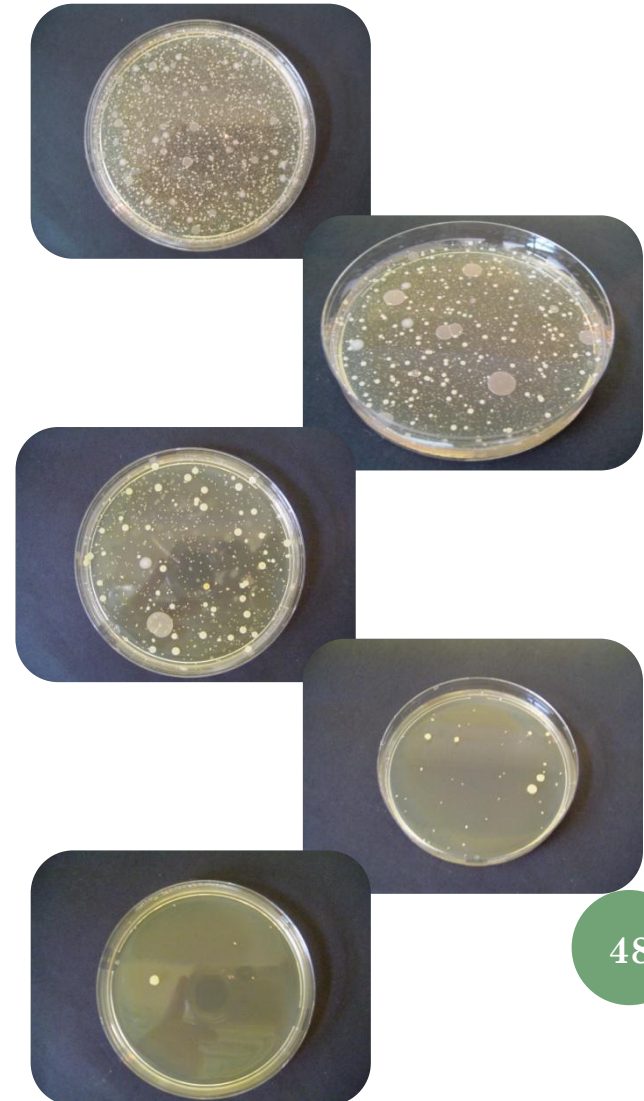


Diluição Semi-Automatizada



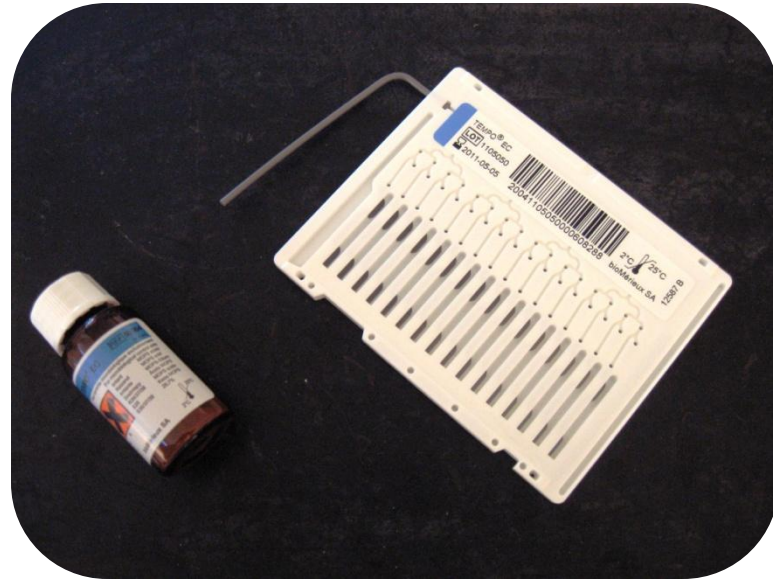
O LABORATÓRIO

Diluição Manual



O LABORATÓRIO

Determinação Semi-Automatizada



O LABORATÓRIO

Diluição Manual

- Aplicável a contagens e pesquisas
- Aplicável a todos os microrganismos
- Mais moroso

Diluição Semi-Automatizada

- Requer técnicos especializados
- Aplicável para a contagem de:
 - Fungos
 - Flora total
 - Bactérias entéricas
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus*
- Menor quantidade resíduos



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra



O LABORATÓRIO

Incubação



O LABORATÓRIO

O circuito da amostra

Recepção
da
Amostra

Inoculação
da
Amostra

Interpretação
de
resultados

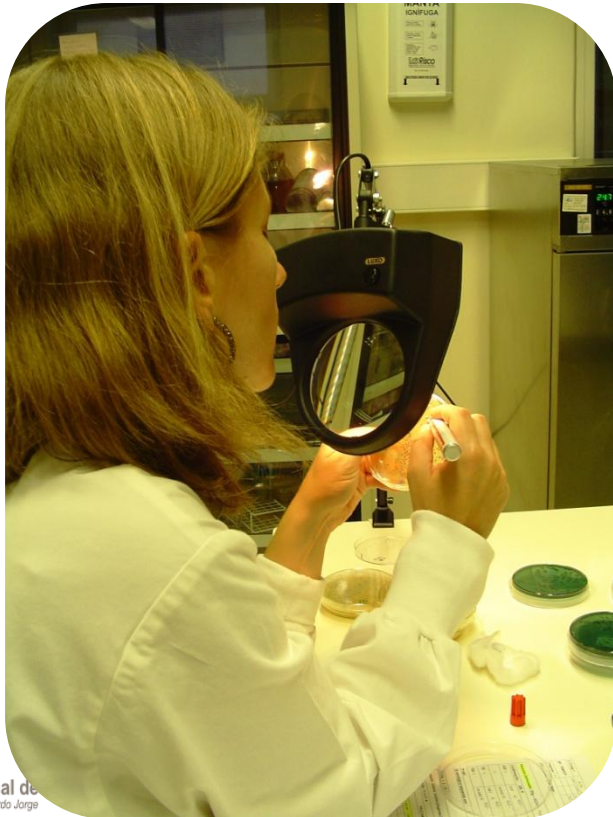
Preparação
da
Amostra

Incubação
da
Amostra

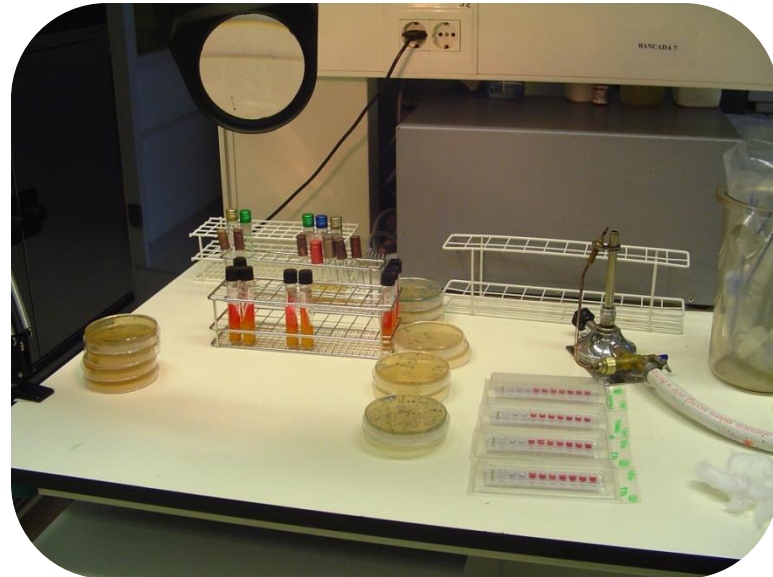


O LABORATÓRIO

Leitura de Resultados



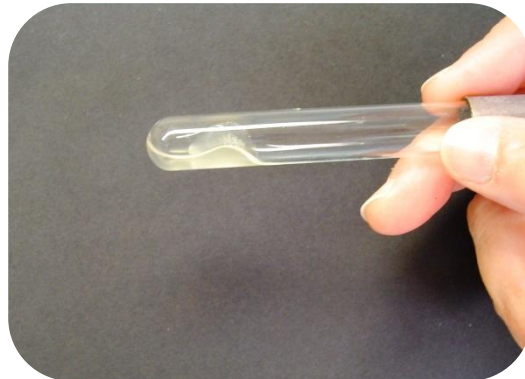
Confirmação de Resultados



O LABORATÓRIO

Leitura de Resultados

- Contagem de placas
- Interpretação de testes (colorações e reacções)



Confirmação de Resultados

- Bioquímicos
- Serológicos



MICROORGANISMOS



Bacillus cereus



Listeria



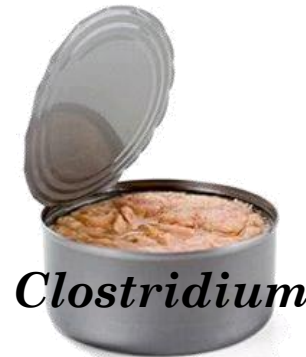
Salmonella



Bolores



Campylobacter



Clostridium



Vibrio

MICROORGANISMOS



Bacillus cereus

- Ubiquitária do solo
- Presente em vegetais, arroz, carne, peixe e produtos lácteos
- Produz esporos
- Produz exotoxinas

- Contagem segundo a norma ISO 7932



MICROORGANISMOS



Campylobacter

- Ubiquiário dos bovinos, ovinos e animais domésticos
- Presente na água e em carne mal cozinhada e leite cru
- Antígenos termoestáveis e termosensíveis
- Pesquisa segundo a norma ISO 10272



MICROORGANISMOS



Clostridium

- Ubiquitário do solo e água
- Produz toxina
- Produz esporos
- Indicador de poluição fecal
⇒ indicador de higiene
- Dose infectante
(nanogramas)

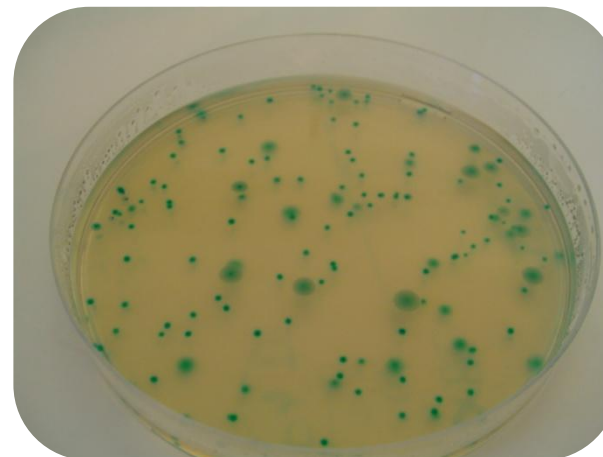
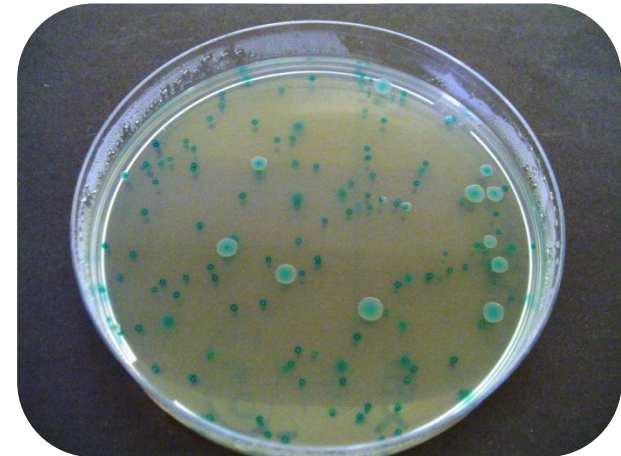
- Contagem segundo a norma
ISO 7937



MICROORGANISMOS

Escherichia coli

- Origem fecal
- Indicador de poluição fecal
⇒ indicador de higiene
- Produz toxina termolábil e termoestável
- Pesquisa pelo método Vidas validado pela AFNOR BIO 12/8-07/00

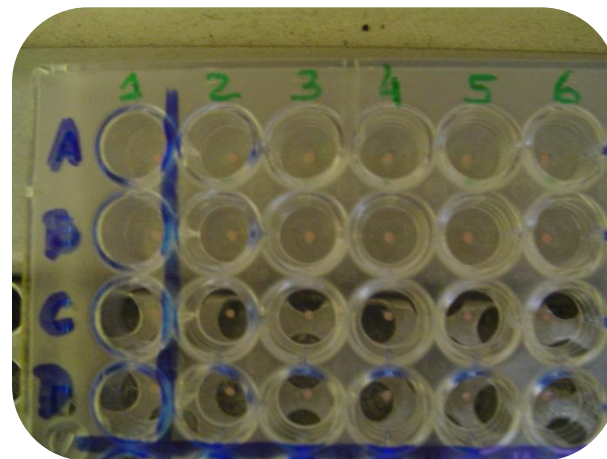


MICROORGANISMOS

Staphylococcus

- Relação de comensalismo ou mutualismo com o Homem
- Presente em carne e derivados, ovos, saladas, produtos lácteos
- Produz toxina
- Associada a infecções oportunistas
- Indicador de Higiene

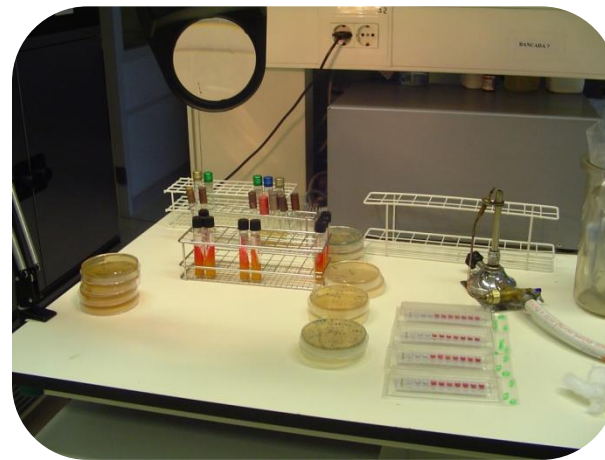
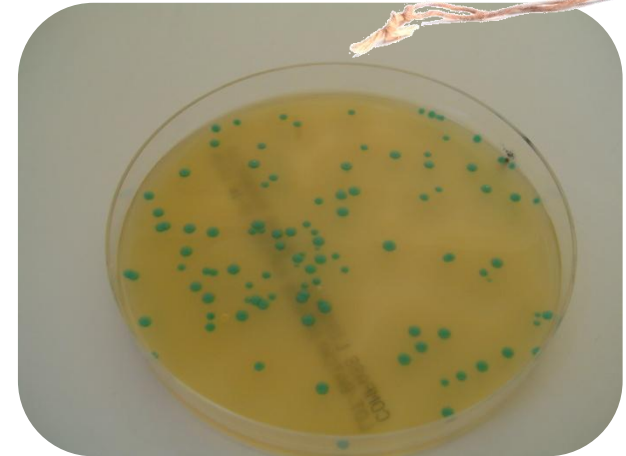
- Contagem segundo a norma ISO 6888



MICROORGANISMOS

Listeria

- Ubiquitária do solo e água
- Presente em vegetais, leite, enchidos, peixe fumado, gelados
- *L. monocytogenes* única implicada em doença humana
- Perigosa para grupos de risco



MICROORGANISMOS

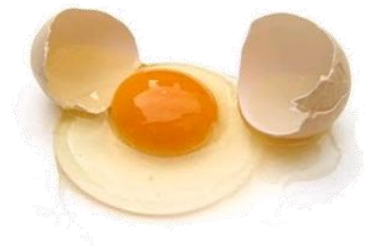


Listeria

- Produz toxina hemolítica e citolítica
- Contagem segundo a norma EN ISO 11290
- Pesquisa pelo método VIDAS



MICROORGANISMOS

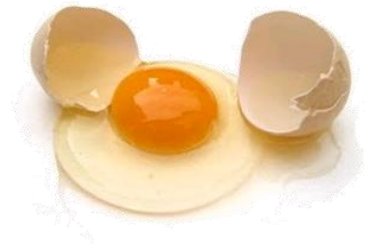


Salmonella

- Presente em carne, especiarias, vegetais, chocolate, leite, ovos, sumos de fruta, peixe, molhos
- Necessária confirmação serológica ⇨ antígenos O, antígenos H e antígenos Vi



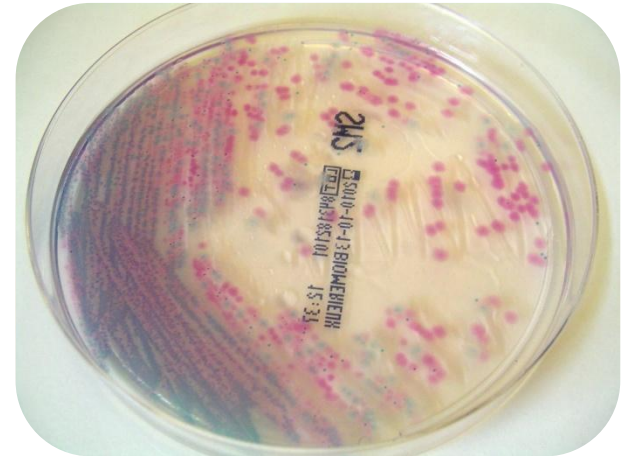
MICROORGANISMOS



Salmonella



- Pesquisa pelo método Vidas validado pela AFNOR BIO 12/01-04-94



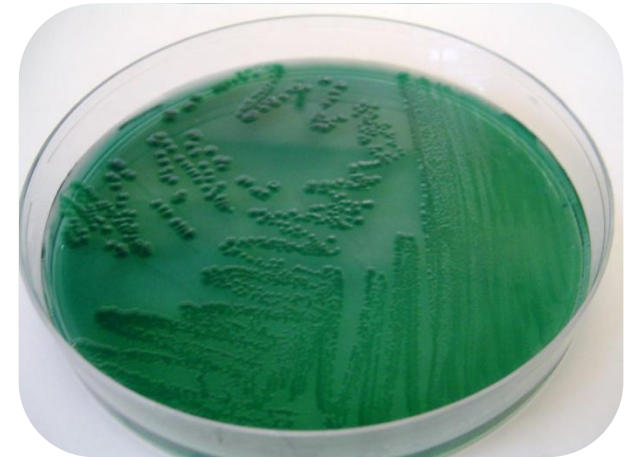
MICROORGANISMOS



Vibrio

- Presente em peixe, marisco, moluscos e água contaminada
- Más confecções de alimentos
- Produz toxina
- Grupos de risco

- Pesquisa segundo a Norma ISO/TS 21872



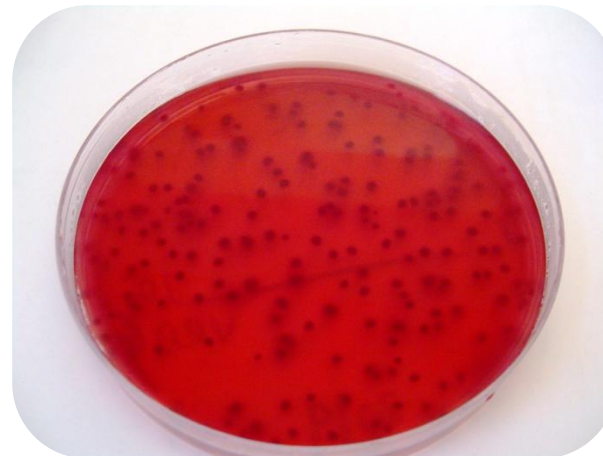


MICROORGANISMOS

Enterobacteriaceae

○ Bactérias entéricas

- *Citrobacter*
- *Enterobacter*
- *Klebsiella*
- *Proteus*
- *Shigella*
- *Yersinia*

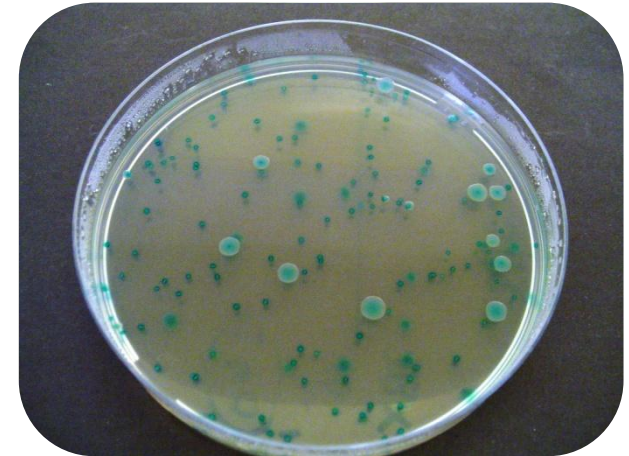




MICROORGANISMOS

Enterobacteriaceae

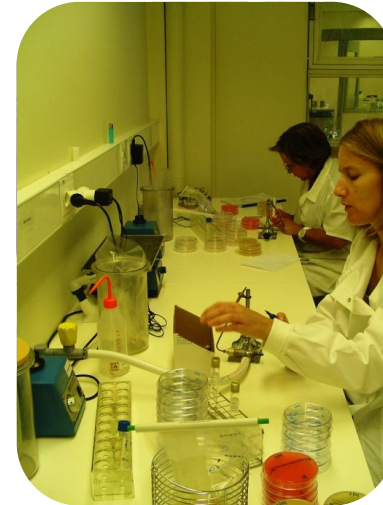
- Ubiquitária do solo, água e plantas
- Indicador de poluição fecal ⇨ indicador de higiene
- Contagem segundo a norma ISO 21528



MICROORGANISMOS

Bolores e Leveduras

- Presente em cereais e derivados, frutos secos, especiarias
- Responsáveis pela decomposição de matéria orgânica
- Produção de Micotoxinas
- Indicador de higiene



MICROORGANISMOS

Bolores e Leveduras

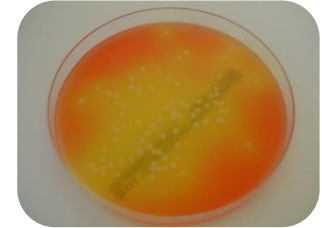
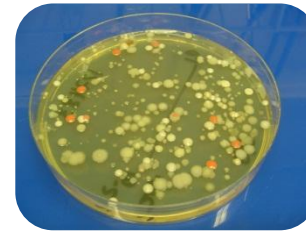
- Contagem segundo o Método Interno NF V08-059



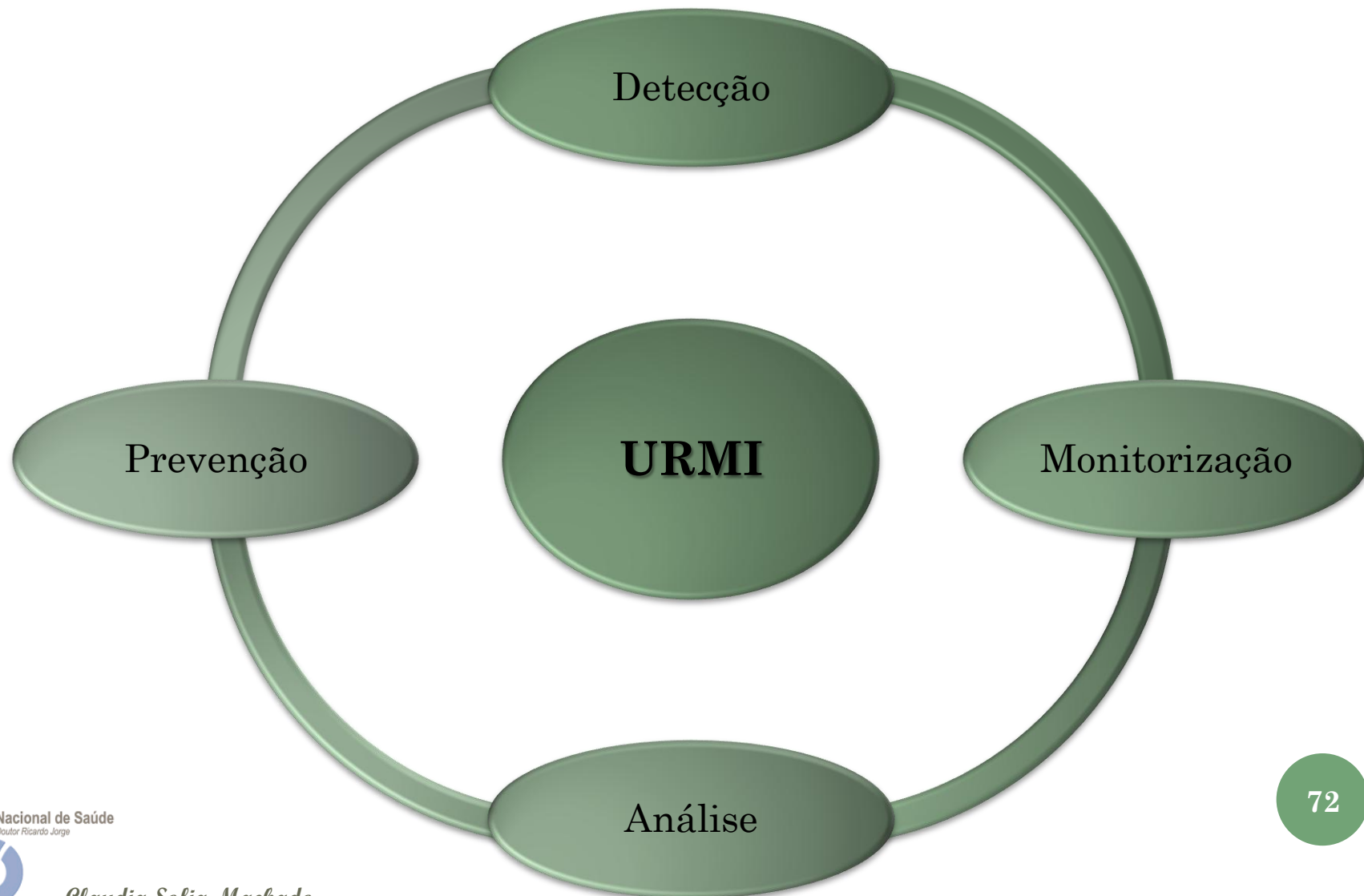
MICROORGANISMOS

Microrganismos a 30°C

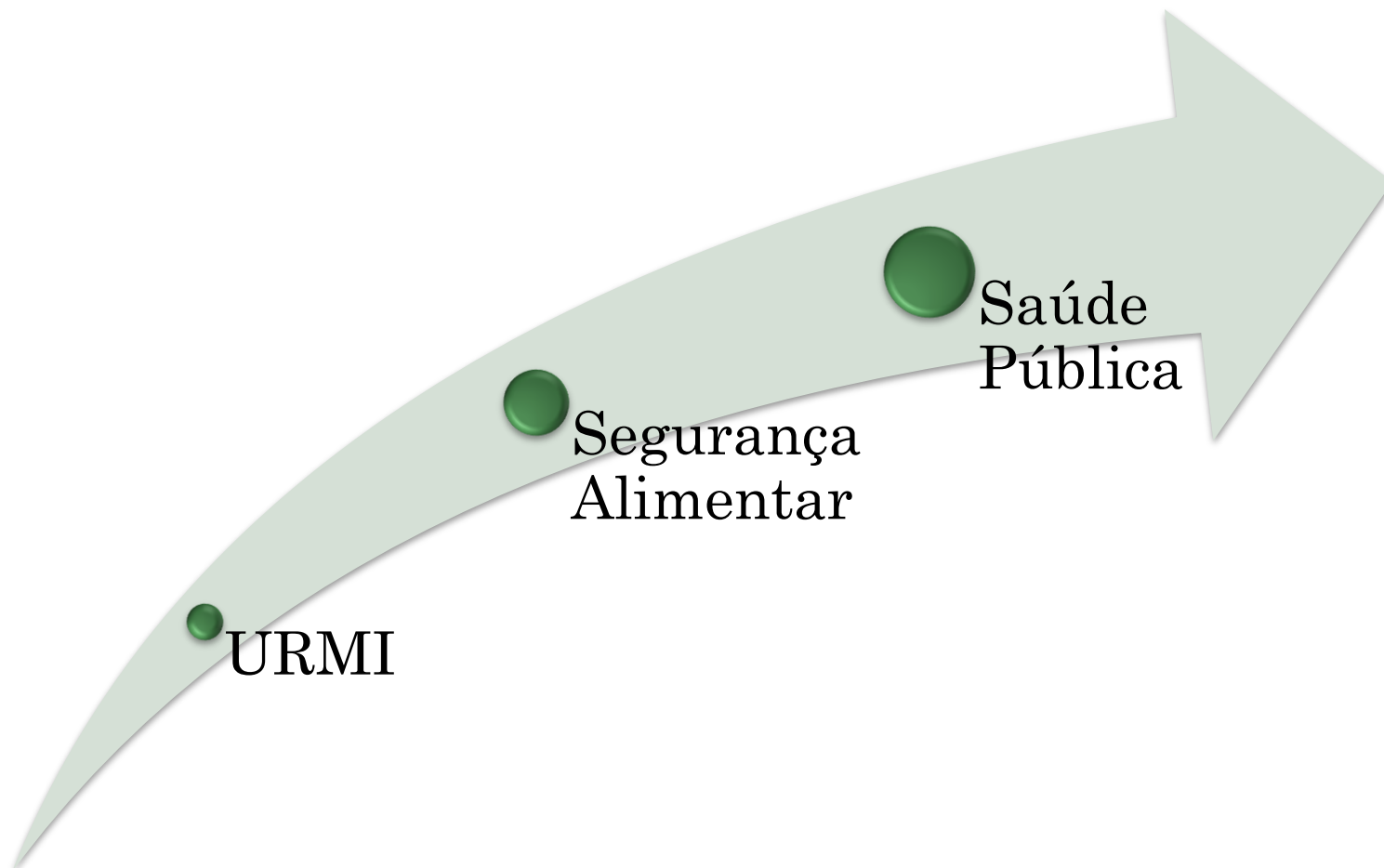
- Incluem todas as bactérias, bolores e leveduras capazes de proliferarem a 30°C em aerobiose
- Indicador de Higiene
- Contagem segundo a Norma NP 4405



CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS



OBRIGADA 😊

