

Sumário

Apresentação	13
---------------------------	-----------

Capítulo 1. Coleta, transporte e estocagem de amostras para análise

1.1. Introdução	19
Lote	19
Amostra de lote e unidade de amostra	19
Planos de amostragem de lotes	20
Unidade analítica	20
1.2. Material necessário	21
1.3. Coleta de amostras para análise	21
1.3.1. Seleção e preparação de frascos para coleta de alimentos acondicionados em embalagens não individuais	22
1.3.2. Procedimentos para a coleta de alimentos acondicionados em embalagens não individuais	22
1.3.3. Coleta de alimentos envolvidos em casos de doenças de origem alimentar (DTAs)	23
1.3.4. Coleta de amostras de água	23
1.4. Transporte e estocagem de amostras até o momento da análise	24
1.4.1. Transporte e estocagem de alimentos com baixa atividade de água	25
1.4.2. Transporte e estocagem de alimentos congelados	25
1.4.3. Transporte e estocagem de alimentos refrigerados	25
1.4.4. Transporte e estocagem de alimentos comercialmente estéreis em embalagens herméticas	27
1.4.5. Transporte e estocagem de amostras de água	27
1.5. Recepção de amostras para a análise	28
1.6. Referências	28

Capítulo 2. Preparação de amostras para análise

2.1. Introdução	31
2.2. Material necessário	32
2.3. Homogeneização da amostra e retirada da unidade analítica	33
2.3.1. Procedimento para a homogeneização e retirada da unidade analítica de produtos líquidos	34
2.3.2. Procedimento para a homogeneização e retirada da unidade analítica de produtos sólidos ou líquidos concentrados	34
2.3.3. Procedimento para a retirada da unidade analítica pela técnica do esfregaço de superfície	35

2.3.3.1. Amostragem com “swabs”	35
2.3.3.2. Amostragem com esponjas	37
2.3.4. Procedimento para a retirada da unidade analítica pela técnica da lavagem superficial	38
2.3.4.1. Procedimento para a lavagem de carcaças de aves	38
2.3.4.2. Procedimento para a lavagem de outros alimentos	38
2.3.4.3. Procedimento para a lavagem de embalagens	38
2.3.5. Guarda de contra-amostras	39
2.4. Preparo da 1ª diluição da unidade analítica	39
Diluentes para os ensaios de presença/ausência	39
Diluentes para os ensaios que requeiram tratamento diferenciado da amostra	39
Diluentes para os ensaios gerais de quantificação	40
Como obter uma diluição inicial 1:10 (10^{-1})	40
Como obter uma diluição inicial diferente de 1:10	40
Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras líquidas	40
Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras sólidas ou líquidos concentrados	40
Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras obtidas por esfregaço de superfície ou por lavagem superficial	41
2.5. Diluição decimal seriada da amostra	41
Como obter a 2ª diluição (10^{-2})	42
Como obter as diluições subsequentes	42
2.6. Referências	42
Anexo 2.1. Procedimentos para a homogeneização do conteúdo e retirada da unidade analítica de amostras de diferentes tipos e alimentos	44
Anexo 2.2. Casos especiais em que há variações na unidade analítica e/ou diluição e/ou diluentes recomendados para a preparação da primeira diluição de amostras de diferentes tipos de alimentos	46

Capítulo 3. Técnicas básicas de contagem de microrganismos em placas

3.1. Introdução	51
3.2. Plaqueamento em profundidade (“pour plate”)	52
3.3. Plaqueamento em superfície (“spread plate”)	54
3.4. Plaqueamento em gotas (“drop plate”)	55
3.5. Filtração em membrana	57
3.6. Contagem das colônias e cálculo dos resultados	59
3.7. Referências	68

Capítulo 4. Técnicas básicas de contagem de microrganismos pelo Número Mais Provável

4.1. Introdução	69
4.2. Teste de diluição múltipla	70
4.3. Teste de diluição única	72
4.4. Cálculo dos resultados	73
4.5. Referências	77
Anexo 4.1. Tabelas de NMP	79

Capítulo 5. Técnicas básicas de detecção da presença/ausência de microrganismos

5.1. Introdução	83
5.2. Material requerido nas análises	88

5.3. Procedimento	89
a) Pré enriquecimento	89
Composição de amostras a seco	89
b) Enriquecimento seletivo	89
Composição úmida de amostras em ensaios com duas etapas de enriquecimento	89
c) Plaqueamento diferencial	90
c.1) Técnica de inoculação por estrias de esgotamento para obter culturas puras	90
d) Seleção de colônias e repique de culturas para confirmação	90
Técnica de repique de culturas puras a partir de colônias isoladas em placas	91
e) Testes de confirmação	91
e.1) Coloração de Gram (método de Hucker)	91
e.2) Coloração de esporos (método de Schaeffer-Fulton)	92
e.3) Coloração de esporos (método de Ashby)	92
e.4) Montagens úmidas para observação microscópica a fresco	92
5.4. Referências	93

Capítulo 6. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em placas

6.1. Introdução	95
6.2. Método de contagem total de aeróbios mesófilos em placas	98
6.3. Método de contagem total de aeróbios mesófilos em Petrifilm™	103
6.4. Método de contagem total de aeróbios psicrotróficos	104
6.5. Referências	105

Capítulo 7. Contagem de bolores e leveduras

7.1. Introdução	107
7.2. Método de contagem total de bolores e leveduras em placas	113
7.3. Método de contagem de fungos psicrotróficos	116
7.4. Método de contagem de bolores termorresistentes	118
7.5. Métodos de contagem de leveduras resistentes aos conservantes (PRY)	119
7.6. Métodos de contagem de leveduras osmofílicas	121
7.7. Referências	122

Capítulo 8. Contagem de enterobactérias

8.1. Introdução	125
Taxonomia	125
Métodos de análise	126
8.2. Método de contagem em placas de VRBG	126
8.3. Método do Número Mais Provável (NMP)	128
8.4. Método do Petrifilm™	130
8.5. Referências	132

Capítulo 9. Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

9.1. Introdução	133
Definição de coliformes totais	133
Definição de coliformes termotolerantes	133
<i>E. coli</i>	134
Aplicação como indicadores	134

Métodos de análise	135
9.2. Método do Número Mais Provável (NMP) (coliformes totais/termotolerantes/ <i>E. coli</i>) em águas e alimentos	137
9.3. Método de plaqueamento em VRB (coliformes totais em alimentos)	143
9.4. Método do ColiComplete™ AOAC 992.30 (Coliformes totais/ <i>E. coli</i> em alimentos)	145
9.5. Método do Petrifilm™ (coliformes totais/ <i>E. coli</i> em alimentos)	147
9.6. Método ISO 7251:2005 (coliformes termotolerantes presuntivo para <i>E. coli</i> em alimentos)	149
9.7. Método do substrato cromogênico Colilert® AOAC 991.15 (coliformes totais e <i>E. coli</i> em água)	151
9.8. Referências.....	152

Capítulo 10. *Staphylococcus aureus*

10.1. Introdução	153
Principais características de <i>S. aureus</i>	153
Métodos de análise	154
10.2. Método de contagem direta em placas	155
10.3. Método do Número Mais Provável (NMP)	160
10.4. Teste de presença/ausência	162
10.5. Referências	164

Capítulo 11. *Bacillus cereus*

11.1. Introdução	165
Grupo <i>B. cereus</i>	165
<i>B. anthracis</i>	165
<i>B. thuringiensis</i>	165
<i>B. mycoides</i>	166
<i>B. pseudomycoides</i>	166
<i>B. weihenstephanensis</i>	166
Principais características de <i>B. cereus</i>	166
Métodos de análise	167
11.2. Método de contagem direta em placas	168
11.3. Método do Número Mais Provável (NMP)	174
11.4. Referências	176

Capítulo 12. Clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*

12.1. Introdução	177
Principais características de <i>C. perfringens</i>	177
Clostrídios sulfito redutores a 46°C	179
Métodos de análise de <i>C. perfringens</i> em alimentos	180
Métodos de análise de clostrídios sulfito redutores a 46°C em alimentos.....	181
Métodos de análise de esporos de clostrídios sulfito redutores e <i>C. perfringens</i> em água	181
12.2. Método de plaqueamento direto (<i>C. perfringens</i> em alimentos)	182
12.3. Teste de presença/ausência (<i>C. perfringen</i> em alimentos)	186
12.4. Método de contagem em placas (clostrídios sulfito redutores a 46°C em alimentos)	187
12.5. Método ISO 6461-1:1986 (esporos de clostrídios sulfito redutores em água)	190
12.6. Método CETESB:1993 (esporos de <i>C. perfringens</i> em água)	191
12.7. Referências	194

Capítulo 13. Contagem de enterococos

13.1. Introdução	195
Importância em alimentos	196
Métodos de análise	196
13.2. Método de contagem em placas (enterococos em alimentos)	197
13.3. Método do Número Mais Provável (NMP) (enterococos em alimentos)	199
13.4. Método da membrana filtrante (enterococos em água)	201
13.5. Referências	203

Capítulo 14. Contagem de bactérias lácticas

14.1. Introdução	205
<i>Leuconostoc</i>	205
<i>Pediococcus</i>	207
<i>Streptococcus</i>	207
<i>Lactobacillus</i>	207
<i>Enterococcus</i>	208
<i>Lactococcus</i>	208
<i>Carnobacterium</i>	209
<i>Vagococcus</i>	209
<i>Tetragenococcus</i>	209
<i>Weissella</i>	210
<i>Oenococcus</i>	210
Métodos de análise	211
14.2. Método de contagem em placas	214
14.3. Método do Número Mais Provável (NMP)	216
14.4. Referências	220

Capítulo 15. *Campylobacter*

15.1. Introdução	223
Taxonomia	223
Patogenicidade	224
Métodos de análise	226
15.2. Método de presença/ausência ISO 10272-1 (2006)	228
15.3. Referências	232

Capítulo 16. *Cronobacter*

16.1. Introdução	235
Taxonomia	235
Características nutricionais e de crescimento	236
Epidemiologia	238
Ecologia	238
Padrão do Codex Alimentarius para <i>Cronobacter</i> sp em fórmulas infantis	240
Métodos de análise	240
16.2. Método de presença/ausência ISO/TS 22964 (2006)	241
16.3. Referências	245

Capítulo 17. *Escherichia coli* O157:H7

17.1. Introdução	247
Sorotipagem	247
Patogenicidade	248
Sorotipos STEC mais envolvidos em surtos	249
<i>E. coli</i> O157:H7 em alimentos	250
Taxonomia	251
Métodos de detecção	253
17.2. Método BAM/FDA	254
17.3. Referências	258

Capítulo 18. *Listeria monocytogenes*

18.1. Introdução	261
Taxonomia	261
Patogenicidade	262
Métodos de análise	263
Cuidados especiais na realização de análises	264
18.2. Método BAM/FDA (2003)	266
18.3. Método MLG/FSIS/USDA (2009)	270
18.4. Método APHA de plaqueamento direto (2001)	274
18.5. Método ISO 11290-2:1998 Amendment 1:2004	275
18.6. Método ISO 11290-1:1996 Amendment 1:2004	282
18.7. Referências	284

Capítulo 19. *Salmonella*

19.1. Introdução	287
Classificação taxonômica de <i>Salmonella</i>	287
Classificação sorológica de <i>Salmonella</i>	288
Características bioquímicas de <i>Salmonella</i>	290
Epidemiologia	292
Métodos tradicionais de análise de <i>Salmonella</i>	293
Métodos alternativos de análise de <i>Salmonella</i>	294
Composição de amostras para a análise	295
19.2. Método ISO 6579:2002 Amendment 1: 2007	296
19.3. Método BAM/FDA (2007)	302
19.4. Método MLG/FSIS/USDA (2008)	314
19.5. Referências	319

Capítulo 20. *Vibrios* patogênicos

20.1. Introdução	321
Taxonomia	321
Epidemiologia	323
<i>V. cholerae</i>	323
<i>V. parahaemolyticus</i>	324
<i>V. vulnificus</i>	324
Métodos de análise	326

20.2. Método APHA/BAM/FDA (presença/ausência de <i>Vibrio cholerae</i>)	327
20.3. Método APHA/BAM/FDA (NMP de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i>)	332
20.4. Referências	338

Capítulo 21. *Yersinia enterocolitica*

21.1. Introdução	341
Taxonomia	341
Epidemiologia	343
Métodos de análise	343
21.2. Método APHA de detecção	344
21.3. Referências	350

Capítulo 22. Contagem de esporos de bactérias

22.1. Introdução	351
22.1.1. Taxonomia das bactérias esporogênicas importantes em alimentos	351
<i>Bacillus</i>	352
<i>Clostridium</i>	355
<i>Sporolactobacillus</i>	358
<i>Desulfotomaculum</i>	359
<i>Alicyclobacillus</i>	359
<i>Thermoanaerobacterium</i>	360
<i>Paenibacillus</i>	361
<i>Aneurinibacillus</i>	362
<i>Brevibacillus</i>	362
<i>Virgibacillus</i>	362
<i>Geobacillus</i>	363
22.2. Métodos de contagem de esporos de termófilos aeróbios totais e “flat sour”	363
22.3. Métodos de detecção de esporos de termófilos anaeróbios não-produtores de H ₂ S (<i>T. thermosaccharolyticum</i>)	369
22.4. Métodos de contagem de esporos de termófilos anaeróbios produtores de H ₂ S (<i>D. nigrificans</i>)	371
22.5. Métodos de contagem de esporos de mesófilos aeróbios	373
22.6. Métodos de contagem de esporos de mesófilos anaeróbios	376
22.7. Métodos APHA para detecção ou contagem de <i>Alicyclobacillus</i>	380
22.8. Método IFU 12:2007 para detecção e contagem de <i>Alicyclobacillus</i>	382
22.9. Referências	386

Capítulo 23. Teste de esterilidade comercial ou causa da deterioração

23.1. Introdução	391
Definição de esterilidade comercial	391
Classificação dos alimentos comercialmente estéreis	391
23.1.1. Parâmetros de avaliação da resistência térmica dos microrganismos	392
Curva de sobrevivência e tempo de redução decimal (valor D)	392
Número de reduções decimais	393
Curva de destruição térmica e coeficiente de temperatura (valor z)	394
23.1.2. Valores D e z de microrganismos de importância em alimentos	395
Células vegetativas	395

Esporos de bolores termorresistentes	395
Esporos de bactérias	395
23.1.3. Dimensionamento de processos térmicos	397
23.1.4. Deterioração microbiana de alimentos enlatados	398
Subprocessamento	398
Vazamento	399
Deterioração por termófilos estritos	399
Multiplicação microbiana antes do tratamento térmico	400
Causas não microbianas de deterioração	400
23.2. Teste de esterilidade comercial e determinação da causa da deterioração de alimentos de baixa acidez	400
23.3. Teste de esterilidade comercial e determinação da causa da deterioração de alimentos ácidos	410
23.4. Referências	418

Capítulo 24. *Pseudomonas* spp

24.1. Introdução	419
<i>Pseudomonas</i> Migula 1894	421
<i>Shewanella</i> Mac Donell & Colwell 1986	423
<i>Janthinobacterium</i> De Ley <i>et al.</i> 1978 emend. Lincoln <i>et al.</i> 1999	424
<i>Stenotrophomonas</i> Palleroni & Bradbury 1993	425
Métodos de análise	425
24.2. Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em água - método dos tubos múltiplos	426
24.3. Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp em carne e produtos cárneos - método ISO 13720:1995	428
24.4. Contagem de <i>Pseudomonas</i> spp em leite e produtos lácteos - método ISO 11059:2009	433
24.5. Referências	437

Capítulo 25. Preparação de material de laboratório para utilização em análises microbiológicas

25.1. Descontaminação e descarte de resíduos contaminados	439
25.2. Lavagem	439
25.3. Acondicionamento	440
25.4. Esterilização	441
25.5. Preparo de vidraria nova	442
25.6. Controle de qualidade do material	442
25.7. Referências	443

Capítulo 26. Cuidados na preparação de meios de cultura e reagentes para análises microbiológicas

26.1. Introdução	445
26.1.1. Ingredientes utilizados na formulação de meios de cultura	445
26.1.1.1. Água para o preparo de meios e reagentes	445
26.1.1.2. Fontes de nutrientes em meios de cultura	445
26.1.1.3. Agentes seletivos	449
26.1.1.4. Agentes diferenciais	450
26.1.1.5. Agentes redutores	450
26.1.1.6. Agentes tamponantes	450
26.1.1.7. Substratos cromogênicos e fluorogênicos	450

26.1.1.8. Ágar	451
26.1.2. Classificação dos meios de cultura	451
26.2. Procedimento para a preparação de meios de cultura	453
26.2.1. Armazenamento dos insumos para preparo de meios de cultura	453
26.2.2. Pesagem e rehidratação	454
26.2.3. Dissolução e dispersão	454
26.2.4. Verificação e ajuste do pH antes da esterilização	454
26.2.5. Distribuição	455
26.2.6. Esterilização pelo calor úmido	455
26.2.7. Esterilização por filtração	456
26.2.8. Verificação depois da esterilização	457
26.2.9. Preparação dos suplementos para meios de cultura	458
26.2.10. Estocagem dos meios esterilizados até o momento do uso	458
26.2.11. Preparação dos meios no momento do uso	458
26.3. Referências	459

Anexo 1

Preparo de meios e reagentes para as análises	461
---	-----

Anexo 2

2A. Resolução RDC No 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA (Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos)	573
2B. Resolução RDC N° 275 de 22 de setembro de 2005 da ANVISA (Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural)	592
2C. Portaria N.º 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade) .	595

Anexo 3

Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em alimentos	611
---	-----