

# **Ensaaios microbiológicos: métodos convencionais *versus* métodos rápidos**

**Joana Patrícia Marques Antunes**

Relatório de estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Nutrição Humana e Qualidade Alimentar, realizado sob a orientação científica da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco e da Doutora Rosália Santos Furtado, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em Lisboa



## **Agradecimentos**

Quero agradecer especialmente,

Aos meus pais por todo o carinho e sacrifício monetário demonstrado ao longo de todo o meu percurso escolar, até porque sem eles nada disto teria sido possível.

Ao meu namorado Roberto Marques por toda a compreensão, carinho e ajuda durante este meu percurso tão importante.

À Professora Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, por ser uma excelente orientadora interna demonstrando sempre disponibilidade, ajuda, carinho e apoio.

À Doutora Rosália Santos Furtado, por todas as dúvidas esclarecidas e também por todo o conhecimento transmitido.

À responsável do laboratório que possibilitou este estágio Engenheira Cristina Belo Correia e a todos que no laboratório me acompanharam e apoiaram de alguma forma: Anabela Coelho, Carla Maia, Helena Marques, Susana Santos, Maria João Barreira e Fernanda Oliveira.

À Professora Doutora Catarina Maria Queirós Monteiro Ventura Gavinhos pela inteira disponibilidade, ajuda e amizade.

À Joana Silva e Jorge Ramalheiro por me terem cedido a casa sem nada pedirem em troca, pela amizade, carinho e ajuda.

À Sílvia Luís, colega de laboratório, por toda a ajuda, disponibilidade, paciência e amizade.

A todas as pessoas que sempre me apoiaram e contribuíram para o meu sucesso escolar.

**Um muito obrigado a todos!**

## Ensaio microbiológico: métodos convencionais *versus* métodos rápidos

### Resumo

Durante o período de estágio, além do trabalho de rotina desenvolvido no laboratório, foi também realizada uma comparação entre dois métodos microbiológicos, nomeadamente o método convencional ISO e o método rápido Petrifilm.

O objetivo deste estudo foi concluir se o método tradicional pode eventualmente ser substituído pelas Placas Petrifilm™ da 3M, por os seus resultados serem comparáveis.

Os dois métodos foram somente comparados na contagem de 4 parâmetros microbiológicos, onde estiveram incluídos os seguintes microrganismos: microrganismos a 30°C, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais a 30°C e também coliformes fecais a 44°C.

No âmbito do trabalho laboratorial, foram obtidas 38 amostras de géneros alimentícios provenientes de casas de restauração coletiva. Nas amostras analisadas, nem sempre se detetou a presença dos mesmos microrganismos, sendo assim, na contagem de aeróbios mesófilos foram utilizadas 27 amostras, tal como na contagem de *Enterobacteriaceae* e na contagem de coliformes totais e fecais, foram utilizadas 33 amostras em ambos os casos.

Através de regressões, verificou-se que em todos os microrganismos comparados, existia uma forte correlação entre os dois métodos estudados. No caso dos microrganismos a 30°C verificou-se um coeficiente de correlação (R) igual a 0,981 e nas *Enterobacteriaceae* verificou-se que o R era igual a 0,954. Relativamente aos coliformes, verificou-se o mais alto valor de R mas também se verificou o valor mais reduzido de R. Nos coliformes totais o R tomou o valor de 0,986 e nos coliformes fecais o R tomou o valor de 0,854.

O método microbiológico rápido Petrifilm mostrou ser um método com inúmeras vantagens, onde os resultados são fiáveis e onde a eficiência não deixa de estar presente.

Concluiu-se que o método tradicional ISO pode ser substituído pelo método rápido Petrifilm.

**Palavras-chave:** Análises microbiológicas; Método convencional ISO; Método rápido Petrifilm; Aeróbios mesófilos; *Enterobacteriaceae*; Coliformes totais; Coliformes fecais.

## Microbiological trials: conventional methods versus rapid methods

### Abstract

During the training period, in addition to routine work done in the laboratory, a comparison between two microbiological methods was also made, in particular the ISO conventional method and Petrifilm rapid method.

The aim of this study was to establish whether the traditional method may optionally be replaced by the 3M™ Petrifilm Plates, by its results are comparable.

The two methods were compared counting only 4 microbiological parameters, which included the following microorganisms: microorganisms at 30°C, *Enterobacteriaceae*, coliforms at 30°C and also fecal coliforms at 44°C.

As part of the laboratory work, 38 samples of food were obtained from catering houses. In the analysed samples, it was not always possible to detect the presence of these organisms, thus on counts of mesophilic aerobes and *Enterobacteriaceae* 27 samples were used. Counting total and fecal coliforms, 33 samples were used in both cases.

Through regressions, it was found that in all compared organisms, there was a strong correlation between the two methods. In the case of microorganisms at 30°C there was a correlation coefficient (R) equal to 0.981 and in *Enterobacteriaceae* it was found that the R equaled 0.954. With regard to coliform, the highest R value was detected but the lowest value of R was also found. In total coliforms R took the value of 0.986 and in fecal coliforms the R value was 0.854.

The Petrifilm rapid microbiological method proved to be a method with many advantages, whose results are reliable and where efficiency is nevertheless present.

It was concluded that the traditional ISO method can be replaced by Petrifilm rapid method.

**Keywords:** Microbiological tests; Conventional ISO method; Petrifilm Rapid method; Mesophilic aerobes; *Enterobacteriaceae*; Total coliforms; Fecal coliforms

## Índice Geral

	Páginas
Agradecimentos	<i>iii</i>
Resumo	<i>iv</i>
Abstract	<i>v</i>
Índice Geral	<i>vi</i>
Índice de figuras	<i>viii</i>
Índice de tabelas	<i>x</i>
Lista de abreviaturas	<i>xi</i>
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Importância das análises microbiológicas na qualidade e segurança alimentar	2
2.2. Laboratório de Microbiologia do INSA	3
2.3. Acreditação do Laboratório de Microbiologia do INSA	5
3. Atividades desenvolvidas no âmbito do estágio	6
3.1. Procedimento da análise microbiológica	7
3.1.1. Colheita, transporte e receção da amostra	7
3.1.2. Preparação da suspensão - mãe	8
3.1.3. Sementeira	9
3.1.4. Incubação	11
3.1.5. Identificação, contagem e confirmação das colónias	11
3.1.6. Expressão de resultados	17
3.1.7. Interpretação de resultados finais	19
3.2. Precisão de dados: repetibilidade e reprodutibilidade	20
3.3. Estimativa de incertezas	20
4. Trabalho laboratorial de comparação	21
4.1. Método Petrifilm	21
4.2. Procedimento laboratorial	21
4.3. Tratamento dos dados	23

4.4. Resultados e Discussão	23
5. Considerações finais	26
Referências Bibliográficas	28
Anexos	30

## Índice de figuras

	Páginas	
Figura 1	Receção das amostras	4
Figura 2	Armazenagem de meios de cultura e reagentes	4
Figura 3	Sala de sementeiras	4
Figura 4	Sala de sementeiras	4
Figura 5	Sala de banhos	5
Figura 6	Sala de preparação da amostra	5
Figura 7	Sala de estagiários	5
Figura 8	Sala de andamentos	5
Figura 9	Sala de estufas	5
Figura 10	Zona suja e zona limpa	5
Figura 11	Aparelho VIDAS®	7
Figura 12	Meio VRBG ( <i>Enterobacteriaceae</i> )	12
Figura 13	Meio TSA ( <i>Enterobacteriaceae</i> )	12
Figura 14	Teste da oxidase (positivo)	12
Figura 15	Teste da glucose (positivo)	12
Figura 16	Meio VRBL (coliformes)	13
Figura 17	Caldo <i>Brilliant Green Lactose Bile</i>	13
Figura 18	Meio TBX ( <i>E. coli</i> )	13
Figura 19	Meio TSC ( <i>Clostridium perfringens</i> )	13
Figura 20	Meio tioglicolato	13
Figura 21	Meio LS (positivo)	13
Figura 22	<i>B. cereus</i> agar ( <i>B. cereus</i> )	14
Figura 23	$\beta$ -hemólise formada por <i>B. cereus</i>	14
Figura 24	Meio BP (Estafilococos coagulase positiva)	14
Figura 25	Meio BHI	14
Figura 26	Coagulase positiva	14
Figura 27	Caldo <i>Fraser</i>	15
Figura 28	ALOA ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	15
Figura 29	Catalase (positiva)	15

Figura 30	API Listeria	15
Figura 31	PCA (aeróbios mesófilos)	15
Figura 32	DRBC (bolors e leveduras)	16
Figura 33	Meio RVS e MKT	16
Figura 34	Colónias características de <i>Salmonella</i> em meio XLD	16
Figura 35	Aspeto característico do meio TSI	16
Figura 36	Sementeira em Petrifilm	22
Figura 37	Placas Petrifilm para contagem de aeróbios mesófilos e aspeto das colónias características após incubação	22
Figura 38	Placas Petrifilm para contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> e aspeto das colónias típicas após incubação	23
Figura 39	Placas Petrifilm para contagem de coliformes e colónias típicas após permanência na estufa	23
Figura 40	Gráfico de regressão que representa a correlação entre o método convencional e o método Petrifilm na contagem de aeróbios mesófilos	24
Figura 41	Gráfico de regressão que representa a correlação entre o método convencional e o método Petrifilm na contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	25
Figura 42	Gráfico de regressão que representa a correlação entre o método convencional e o método Petrifilm na contagem de coliformes totais	25
Figura 43	Gráfico de regressão que representa a correlação entre o método convencional e o método Petrifilm na contagem de coliformes fecais	26

## Índice de tabelas

		Páginas
Tabela 1	Ensaio acreditado no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do INSA, Lisboa	6
Tabela 2	Meios de cultura e reagentes utilizados no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do INSA, Lisboa	10
Tabela 3	Significado dos termos utilizados para expressar a qualidade microbiológica nos alimentos prontos a consumir	20

## Lista de abreviaturas

INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
DAN	Departamento de Alimentação e Nutrição
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
AFNOR	<i>Association Française Normalisation</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
EN	<i>Europäische Norm</i>
(E)	<i>English</i>
(CE)	Comunidade Europeia
OMS	Organização Mundial de Saúde
HACCP	<i>Hazard Analysis Critical Control Points</i>
HPA	<i>Health Protection Agency</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
Amd	<i>Amendment</i>
ELFA	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
LMO2	<i>Listeria monocytogenes 2</i>
SLM	<i>Salmonella</i>
EB	<i>Enterobacteriaceae</i>
EC	<i>Escherichia coli</i>
TVC	<i>Total Viable Count</i>
TS	<i>Technical Specification</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
Ref.	Referência
APT	Água Peptonada Tamponada
VRBG	<i>Violet Red Bile Glucose</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>

<b>VRBL</b>	<i>Violet Red Bile Lactose</i>
<b>TBX</b>	<i>Tryptone Bile Glucuronide</i>
<b>TSC</b>	<i>Tryptone Sulfite Cycloserine</i>
<b>LS</b>	<i>Lactose Sulfite</i>
<b>BP</b>	<i>Baird Parker</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>ALOA</b>	<i>Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti</i>
<b>RVS</b>	<i>Rappaport Vassiliadis Soja</i>
<b>MKT</b>	<i>Mueller Kaufman Tetrinationato</i>
<b>XLD</b>	<i>Xylose Lysine Desoxycholate</i>
<b>SMID II</b>	<i>Gelose ChromoID Salmonella</i>
<b>TSI</b>	<i>Triple Sugar Iron</i>
<b>DRBC</b>	<i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol</i>
<b>BS</b>	<i>British Standards</i>
<b>INC</b>	Incontável
<b>ufc/g</b>	Unidades formadoras de colónias por grama
<b>ufc/ml</b>	Unidades formadoras de colónias por mililitro
<b>R</b>	Coeficiente de <i>Pearson</i> ; Coeficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinação; Coeficiente de correlação total