

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR – OS  
DESAFIOS ACTUAIS E FUTUROS**

**Dissertação**

**Catarina Alexandra Machado Gomes de Sousa**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2012**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR – OS  
DESAFIOS ACTUAIS E FUTUROS**

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Crespo (Instituto de Biologia  
Experimental e Tecnológica) e pelo Professor Doutor Rogério Tenreiro  
(Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Catarina Alexandra Machado Gomes de Sousa

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2012**



# **LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR – OS DESAFIOS ACTUAIS E FUTUROS**

**Catarina Alexandra Machado Gomes de Sousa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**2012**

Esta dissertação foi realizada no IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica) sob a orientação directa da Doutora Teresa Crespo no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O Prof. Doutor Rogério Tenreiro foi o orientador interno designado no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

“Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.”

Winston Churchill

## *AGRADECIMENTOS*

À Doutora Maria Teresa Crespo um sincero agradecimento pela sua orientação, apoio, transmissão de conhecimentos, incentivo, paciência e disponibilidade total.

Ao IBET, pelas condições disponibilizadas para a realização da tese.

Ao Prof. Doutor Rogério Tenreiro agradeço a orientação e apoio dado.

Ao Dr. António Ferreira agradeço a disponibilidade, a paciência e a orientação dada na parte de implementação/validação de métodos.

I would like to thank Dr. Lombard for the permission to use data, availability and the quickness in answering our questions.

À Dra. Ana Luísa Simplicio agradeço a sua disponibilidade para esclarecimento de dúvidas sobre precisão de métodos.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente à minha colega Ana Góis, por todo o apoio, solidariedade, incentivo e amizade.

Aos meus pais e irmãos, Daniel e Rita, o meu profundo agradecimento pelo interesse, apoio e incentivo dado ao longo destes dois anos de mestrado.

À Zézinha pelo apoio, curiosidade, interesse e paciência nos momentos menos inspirados.

Ao André por todo o amor, carinho, paciência, incentivo e disponibilidade total.

Aos meus amigos o meu agradecimento pelo apoio, incentivo e amizade.

## RESUMO

Esta tese compila a informação disponível até à data em termos das necessidades que os laboratórios de microbiologia alimentar têm quando pretendem montar métodos alternativos, analisar resultados obtidos face à legislação e quais os microrganismos patogénicos emergentes a considerar.

A legislação alimentar e os guias têm critérios microbiológicos para alimentos. Os guias de Portugal, Reino Unido, Hong Kong e Nova Zelândia foram analisados em pormenor. As principais diferenças são o modo como cada guia divide as categorias alimentares para análise de microrganismos totais e a escolha dos microrganismos indicadores e patogénicos para análise. Recomenda-se que, conforme os objectivos dos operadores alimentares e dos laboratórios, sejam analisados os guias aqui referidos, para obter informações sobre critérios microbiológicos para microrganismos indicadores e patogénicos que estão ausentes no guia português.

A origem das doenças alimentares não tem sido a mesma ao longo das décadas. A prevalência dos microrganismos patogénicos que causam essas doenças tem sofrido alterações, devido a factores como a capacidade laboratorial de os detectarmos, medidas de prevenção e controlo e factores de emergência. Embora seja difícil prever que microrganismos possam emergir no panorama das doenças alimentares, alguns já estão referidos em normas ISO, outros como norovirus, vírus da hepatite A, *Cryptosporidium*, *Trichinella*, *Clostridium botulinum* irão no futuro ser objecto de normas ISO e outros como *Aeromonas* spp. são alvo de publicações científicas, o que indica a conveniência de serem considerados.

O desenvolvimento de métodos alternativos surgiu devido à necessidade crescente de obter resultados cada vez mais rápidos e com menor carga de trabalho. Para implementação de métodos alternativos pelos laboratórios, e face à inexistência de documentos que auxiliem os laboratórios, sugerem-se protocolos de implementação. Para métodos qualitativos os laboratórios devem verificar o LOD<sub>50</sub> e para métodos quantitativos devem verificar a exactidão, a repetibilidade, a precisão intermédia e a incerteza.

Palavras-Chave: Critérios microbiológicos, microrganismos patogénicos alimentares, métodos alternativos, implementação de métodos

## ABSTRACT

This thesis gathers all the information available to date, in terms of the needs that the food microbiology laboratories have, when intending to implement alternative methods, analyze the results obtained in relation to legislation and which emerging pathogenic microorganisms should be considered.

Microbiological criteria for food are present in food legislation and guidelines. Guidelines from Portugal, United Kingdom, Hong Kong and New Zealand were studied in detail. The main differences are how each guideline divides the food categories for the analysis of total microorganisms and the choice of pathogenic and indicator microorganisms for analysis. It is recommended that, depending on the objectives, food operators and laboratories should be able to consult these guidelines, in order to obtain information on the microbiological criteria for pathogenic and indicator microorganisms absent from the Portuguese guidelines.

The origin of foodborne diseases has not been the same over the decades. The prevalence of pathogenic microorganisms which cause diseases has been changing, due to factors such as laboratory capacity for microorganism detection, prevention and control measures and emergence factors.

Although it is difficult to predict which microorganisms could emerge to cause foodborne diseases, some are already in ISO standards, and others such as norovirus, A hepatitis virus, *Cryptosporidium*, *Trichinella*, *Clostridium botulinum* will have ISO standards in the future, and others like *Aeromonas* spp. are in scientific publications, indicating that they should be considered.

The development of alternative methods arised from the increasing necessity of obtaining faster results with lower workload. For implementation of alternative methods and in the absence of documents that help laboratories, we suggest implementation protocols. Laboratories should verify LOD<sub>50</sub> for qualitative methods, and accuracy, repeatability, reproducibility and uncertainty for quantitative methods.

Keywords: Microbiologic criteria, foodborne pathogenic microorganisms, alternative methods, methods implementation

# ÍNDICE

Índice de figuras .....	ix
Índice de tabelas.....	x
<b>1. Enquadramento .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Segurança Alimentar.....</b>	<b>3</b>
2.1. Legislação alimentar base .....	4
2.2. Critérios microbiológicos .....	6
2.2.1. Legislação aplicável a critérios microbiológicos .....	8
2.2.2. Valores Guia.....	8
<b>3. Microrganismos patogénicos e patogénicos emergentes.....</b>	<b>12</b>
3.1. Microrganismos patogénicos alimentares .....	12
3.2. Factores que influenciam a emergência e o aumento de infeções alimentares.....	17
<b>4. Laboratório de Microbiologia.....</b>	<b>21</b>
4.1. Que métodos escolher? .....	21
4.1.1. Métodos Convencionais .....	22
4.1.2. Métodos Alternativos .....	23
4.2. Implementação de métodos validados.....	26
4.2.1. Obrigatoriedade de verificação/implementação .....	27
4.2.2. Como fazer a implementação dos métodos e que características devem ser estudadas? .....	27
4.2.3. Implementação do método alternativo .....	28
4.2.4. Qualificação do Analista .....	35
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>38</b>
Anexo 1. Valores guia para Microrganismos Indicadores .....	42
Anexo 2. Valores guia para Microrganismos Patogénicos.....	43
Anexo 3. Valores guia para Microrganismos Totais – Guias de Portugal, Nova Zelândia e Hong Kong.....	45
Anexo 4. – Valores guia para Microrganismos Totais- Guia HPA UK.....	46
Anexo 5. Guia Hong Kong - Categorias de alimentos definidos para critérios microbiológicos de Microrganismos Totais.....	47
Anexo 6. Microrganismos patogénicos alimentares – Alimentos associados, período de incubação, dose infecciosa, sintomas e duração da doença de origem alimentar. ....	48
Anexo 7. Folha de cálculo do Excel para determinação do LOD <sub>50</sub> .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolução do reconhecimento dos microrganismos ao longo das décadas: maiores agentes de doenças infecciosas intestinais. ....	15
<b>Figura 2.</b> Principais factores que influenciam a emergência de infecções alimentares.....	18

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos microrganismos pesquisados nos guias referenciados .....	11
<b>Tabela 2.</b> Características de métodos para a validação e verificação de métodos .....	29
<b>Tabela 3.</b> Exemplo de cálculo de repetibilidade. ....	34

## ABREVIATURAS

AESA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

AFNOR – Associação Francesa de Normalização

AOAC (OMA) - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis

AOAC RI - Association of Official Analytical Chemists Research International

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

BSE - encefalopatia espongiforme bovina

CDC – Center for Disease Control

CFS – Centre for Food Safety

DGV- Direcção Geral de Veterinária

ELFA - Enzyme-linked Fluorescent Assay

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HACCP - Hazard analysis and critical control points

HIV - Human immunodeficiency vírus

HPA –Health Protection Agency

ID50 – Dose infecciosa

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – International Organization for Standardization

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MAP – Atmosfera modificada para embalagens

MRC – Material de Referência Certificado

NMP – Número Mais Provável

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - polymerase chain reaction

SARS - Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

ufc – unidades formadoras de colónias

VRBL – Violet Red Bile Lactose Agar

VRBG - Violet Red Bile Glucose Agar

VTEC – *Escherichia coli* verotoxigénica

## 1. ENQUADRAMENTO

As alterações no estilo de vida, os novos hábitos alimentares e estilos culinários, o aumento das trocas comerciais internacionais, a procura de alimentos sazonais independentemente da estação do ano e a produção em massa dos alimentos são factores que levam os intervenientes na indústria alimentar e os especialistas na matéria a terem preocupações com a qualidade e a segurança dos alimentos consumidos. As questões de qualidade e segurança alimentar deixaram de ser questões unicamente técnicas e científicas, sendo agora também partilhadas pelos consumidores que têm acesso fácil à informação e estão muito mais alerta. A tradução dessa preocupação é feita a nível nacional e europeu, através de um sistema de controlo da qualidade e segurança montado à volta da indústria alimentar, desde a entrada dos alimentos na cadeia de produção até ao consumidor final, que se traduz na aplicação de normas, legislação, boas práticas de higiene e implementação de sistemas de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points).

A orientar e a enquadrar o panorama da qualidade e segurança alimentar surgiram nas últimas décadas na União Europeia uma série de regulamentos. Em 2002 foi publicado o regulamento (CE) No 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que estabelece os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (AESA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos alimentos. Entre outros objectivos, este regulamento pretende assegurar um nível elevado de protecção da saúde humana e dos interesses dos consumidores relativamente aos alimentos, assegurar que o nível de segurança alimentar entre os vários estados membros seja idêntico de modo a permitir o movimento livre de alimentos e assegurar que seja feita a atribuição de responsabilidades aos intervenientes da cadeia alimentar, desde os operadores alimentares aos próprios estados membros [1].

A partir deste regulamento, também conhecido como Lei Geral dos Alimentos, foram publicados uma série de regulamentos que possibilitam um maior controlo e vigilância por parte das autoridades oficiais mas que também servem para que todos os intervenientes na indústria alimentar possam conhecer e cumprir os requisitos a que estão obrigados. No ponto 2.1 desta dissertação “Legislação Alimentar Base” pretende-se enquadrar os laboratórios de microbiologia na legislação aplicável.

Os laboratórios de microbiologia alimentar têm um papel importante quando se trata de assegurar a qualidade e segurança dos alimentos e prevenir ocorrências nefastas. A análise microbiológica é também usada pelas autoridades para controlar a qualidade dos alimentos e prever possíveis riscos [2]. A finalidade do ponto 2.2. “Critérios Microbiológicos” é fazer uma introdução a este tipo de critérios, nomeadamente o que são e quais são as diferenças entre os critérios microbiológicos presentes em regulamentos comunitários como o Regulamento (EC) No 2073/2005 e os chamados valores guias como os do guia do INSA. Os critérios microbiológicos presentes no Regulamento (EC) No 2073/2005 alterado pelo Regulamento (EC) No 1441/2007 para controlar a qualidade dos alimentos e para assegurar o bom

funcionamento da estratégia de gestão de segurança alimentar são usados pelos operadores alimentares como suporte legal e pelos laboratórios como indicador técnico

Existe na indústria alimentar uma valorização e aceitação cada vez maior da necessidade de estabelecer boas práticas de higiene e da implementação dos sistemas de HACCP. O controlo destas práticas depende de resultados analíticos químicos ou microbiológicos que são depois avaliados contra valores guias publicados (geralmente no caso dos alimentos já prontos para consumo) ou por cartas de tendências (geralmente usados pelos produtores de alimentos).

Em Portugal temos disponível o guia do INSA para alimentos prontos a comer, que tem critérios microbiológicos que servem de consulta para os laboratórios que executam análises para a indústria alimentar, com sistemas de HACCP implementados [3]. No ponto 2.2.2. “Valores Guias” explica-se em pormenor onde se podem aplicar e em que medida a classificação dos alimentos, os microrganismos e os critérios existentes no guia INSA são idênticos ao que existem em outros guias internacionais.

A emergência dos microrganismos patogénicos alimentares é um assunto importante a nível internacional e que tem em conta uma série de factores associados. No ponto 3. “Microrganismos patogénicos e patogénicos emergentes” é feita uma revisão de conceitos relacionada com as doenças de origem alimentar, as suas origens, a importância mundial, o tipo de microrganismos envolvidos e o modo como a detecção e a importância associada aos microrganismos tem mudado ao longo das décadas. Por outro lado, é abordado o conceito de emergência e os factores gerais que contribuem para essa emergência, de modo a alertar os laboratórios para este problema. O tipo de microrganismos analisados nos laboratórios de microbiologia depende muitas vezes do tipo de clientes e das legislações a que estes estão sujeitos e das dimensões e capacidade de inovação dos próprios laboratórios. Pretende-se disponibilizar mais uma ferramenta de trabalho que permita aos laboratórios decidirem a necessidade de implementação de novas técnicas para análise de outros microrganismos patogénicos.

Para que se possam tomar decisões rápidas e eficientes sobre a qualidade e segurança alimentar, por parte dos intervenientes da indústria alimentar, há necessidade de se obterem resultados rápidos e seguros sobre microrganismos patogénicos ou sobre microrganismos indicadores de contaminação [4]. A escolha dos métodos usados nos laboratórios é assim muito importante, para que estes possam dar resultados reais e fiáveis no menor tempo possível. No ponto 4.1. “Escolha de métodos” pretende-se fazer um resumo dos métodos alternativos mais usados nos laboratórios de microbiologia e apresentar as vantagens e desvantagens destes métodos relativamente aos métodos clássicos.

Os laboratórios sempre escolheram implementar métodos normalizados, como os métodos publicados pela International Organization for Standardization (ISO), por serem validados e por serem mais fáceis de avaliar através de ensaios interlaboratoriais. A maioria dos métodos normalizados baseiam-se em métodos clássicos, que exigem trabalho laboratorial intenso e demorado que por sua vez produzem resultados lentos. Os métodos designados por

clássicos são, resumindo de uma forma simplista, baseados em preparações de diluições decimais da amostra, do plaqueamento em meios sólidos e detecção/contagem de colónias de microrganismos que crescem nesses meios.

Com a evolução tecnológica e biotecnológica surgiram métodos alternativos que permitem resultados mais rápidos, com menor exigência de trabalho de bancada e de tempo do pessoal. Existe uma grande variedade de métodos alternativos disponíveis no mercado que foram validados contra métodos clássicos de acordo com a norma ISO 16140 e que podem assim ser usados nos laboratórios de microbiologia [5]. É necessário no entanto que os laboratórios se certifiquem que esses métodos cumprem com os requisitos de qualidade nas suas instalações, com os seus equipamentos e o seu pessoal, ou seja, os laboratórios têm de fazer uma implementação desses métodos. A implementação de métodos em microbiologia alimentar ainda é um campo pouco conhecido, não existindo muitos documentos que auxiliem os laboratórios nesse processo, o que leva a que muitos façam implementações incompletas e outros façam estudos de implementação complexos, extensos, associados a um grande custo de recursos financeiros e de tempo. O ponto 4.2 “Implementação de métodos validados” desta tese pretende colmatar estas deficiências e ajudar os laboratórios a integrar a implementação dos métodos e o controlo de qualidade para que possam reduzir os custos e tempo associados a esses processos.

Esta tese, embora não envolvendo investigação experimental, pretende ser um manual de utilização prática para os laboratórios de microbiologia alimentar que realizam análises de rotina em alimentos, rações e ambientes de produção de alimentos, quer sejam ou não acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) ou instituição internacional afim, como cumprindo a norma ISO 17025 ou um sistema de qualidade [6].

## 2. SEGURANÇA ALIMENTAR

Desde os primórdios da humanidade que o Homem se habituou a caçar, pescar, recolher, para obter os alimentos necessários à sua subsistência. A procura de alimentos era feita para satisfazer as necessidades alimentares da família, da tribo ou da aldeia. A principal preocupação era o armazenamento dos alimentos de forma segura de modo a que fossem satisfazendo as necessidades alimentares ao longo de dias, semanas ou mesmo estação. A produção era realizada em pequena escala e as famílias tinham conhecimentos empíricos que lhes permitiam avaliar grosseiramente a inocuidade dos alimentos. Essa prática ainda existe em algumas partes do globo, mas as práticas mudaram para uma necessidade de produção alimentar em maior quantidade e por vezes a grande distância do ponto de consumo, de modo a satisfazer as necessidades de um maior número de pessoas. Assim, as preocupações passaram a ser como produzir em maiores quantidades e do mesmo modo assegurar a qualidade dos alimentos durante a produção, armazenamento e distribuição.

A partir do momento em que a produção passou de uma escala familiar para uma escala regional, nacional e actualmente global, os problemas associados à segurança alimentar passaram a ser geridos a nível nacional e internacional.

Ao depender de vários intervenientes, ao nível da produção, do processamento e da distribuição dos alimentos, a responsabilidade na cadeia alimentar deixou de estar centrada numa só pessoa/entidade [7]. Por outro lado, o aumento das trocas comerciais internacionais levou a um aumento da deslocalização de todo o processo alimentar. Os alimentos deixaram de ser consumidos unicamente nos locais onde são produzidos e o mercado alimentar internacional tem vindo a aumentar de tamanho e de diversidade [7-9].

As doenças de origem alimentar constituem um problema de saúde pública a nível mundial e suscitam muitas preocupações em termos económicos. As mudanças no estilo de vida, o aumento de viagens, as alterações no sistema de produção alimentar, a susceptibilidade e o envelhecimento das populações, a mobilidade populacional e as alterações nos comportamentos de consumo levaram a um aumento da incidência de doenças de origem alimentar por todo o mundo [10]. Com o aumento das trocas comerciais internacionais existe também o receio de transmissão de doenças em áreas onde antes não existiam, ou mesmo a potencialização de aparecimento dos chamados microrganismos patogénicos emergentes [9].

Houve portanto uma necessidade de conciliar procedimentos de segurança alimentar que fossem aceites internacionalmente.

## *2.1. LEGISLAÇÃO ALIMENTAR BASE*

Na Europa, a preocupação com a segurança e higiene alimentar esteve sempre presente, mas foi a criação do mercado único europeu na década de 90 do século XX e depois as crises criadas com a Doença das Vacas Loucas (BSE- Encefalopatia Espongiforme Bovina) e mais tarde a presença de dioxinas em produtos alimentares de origem belga que levaram a que a União Europeia percebesse que existiam muitas falhas no sistema de controlo alimentar. Em 2000 foi publicado o Livro Branco que pretendia demonstrar os objectivos futuros da Comissão para a legislação alimentar [8, 11].

Decorrente do Livro Branco, foi aprovado o "Regulamento (CE) No 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que estabelece os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (AESA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos alimentos. Este regulamento é também conhecido como a Lei Geral dos Alimentos e pretende assegurar um grande nível de protecção da saúde humana e dos interesses dos consumidores relativamente aos alimentos [1]. A AESA é uma agência independente que fornece pareceres científicos e o suporte técnico e científico necessário em todos os domínios da segurança alimentar. É também responsável pela avaliação, caracterização e monitorização de riscos que possam ter impacto na segurança alimentar.

Para tal, a segurança alimentar é assegurada através de análise científica de riscos e através do Princípio da Precaução, que é aplicado a alimentos que possam apresentar riscos para a saúde e para os quais não existam ainda análises científicas de risco. Este princípio tem como objectivo a prevenção de danos, mas não pretende ser um entrave às trocas comerciais, para além do necessário para proteger a saúde humana [1].

Antes da publicação deste regulamento, os estados membros possuíam princípios e regras alimentares diferentes entre si. Este regulamento pretendeu fazer uma harmonização de conceitos e requisitos entre os estados membros, para que o nível de segurança alimentar seja idêntico entre estes, de modo a permitir o movimento livre de alimentos com um nível de segurança elevado para os consumidores. O regulamento define ainda que todo o alimento que não seja considerado seguro, seja retirado do mercado [1].

Outro ponto importante do regulamento é o de atribuição de responsabilidades aos intervenientes da cadeia alimentar, desde os operadores alimentares aos próprios estados membros. Assim, os operadores alimentares são os responsáveis em todos os passos de produção, do processamento e distribuição, por assegurar que os alimentos ou géneros alimentícios satisfaçam os requisitos do regulamento. Por outro lado, os estados membros são obrigados a manter um sistema de controlo oficial que permita implementar, monitorizar e vigiar o cumprimento dos requisitos legais pelos operadores alimentares [1].

Em Abril de 2004 foram publicados três regulamentos, nº 852/2004, nº 853/2004 e nº 854/2004, que vieram enriquecer a legislação de segurança alimentar.

O Regulamento (EC) No 852/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, estabelece as regras para os operadores alimentares. Neste regulamento é estabelecida a responsabilidade primária dos operadores relativa à higiene dos géneros alimentícios, por toda a cadeia alimentar, enquanto estiver sob o seu controlo. Por outro lado, exige que os operadores alimentares implementem procedimentos permanentes baseados nos princípios do HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), juntamente com aplicação de boas práticas de higiene [12]. A utilização de um sistema HACCP por parte dos operadores obriga estes a fazer uma análise dos potenciais perigos associados ao processo, identificando os pontos críticos onde possam ocorrer perigos e onde podem aplicar controlos para evitar a ocorrência desses perigos, de modo a assegurar a segurança dos alimentos. Segundo este regulamento, os operadores alimentares são também obrigados a cumprir com os critérios microbiológicos para os géneros alimentícios e a tomar todas as medidas necessárias para os conseguir cumprir [8, 12, 13].

O regulamento (EC) No 853/2004 decorre da necessidade de se estabelecerem regras específicas de higiene para certos tipos de géneros alimentícios, como é o caso dos géneros alimentícios de origem animal. Uma das regras fundamentais, para assegurar a segurança dos alimentos, é a necessidade da rastreabilidade dos géneros alimentícios, pelo que os operadores devem assegurar que todos os produtos de origem animal, colocados por si no mercado, tenham uma marca de salubridade ou de identificação. Existem também regras definidas para os produtos de origem animal de fora da comunidade, que os operadores

alimentares devem respeitar se quiserem importar produtos de origem animal provenientes de países terceiros [14].

Para além dos operadores alimentares, a legislação comunitária também obriga a que seja feito o controlo oficial por parte dos estados membros, de modo a que se assegure que os operadores alimentares cumprem a legislação. Assim, o regulamento (EC) No 854/2004 estabelece as regras específicas para a organização de controlos oficiais de produtos de origem animal para consumo humano. Estes controlos pretendem verificar se os operadores de empresas alimentares cumprem com as regras de higiene e respeitam os critérios microbiológicos definidos na legislação [14, 15].

Mais tarde foi publicado o regulamento (EC) No 882/2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais [16].

Quanto à legislação nacional aplicável, o Decreto-Lei nº 113/2006 define quais as entidades responsáveis pelo controlo da aplicação dos regulamentos (CE) No 852/2004 e No 853/2004 em Portugal, atribuindo-se ainda poderes de fiscalização à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) e à Direcção-Geral de Veterinária (DGV). O decreto-lei estabelece ainda o regime sancionatório aplicável às infracções às normas, define o processo aplicável à aprovação dos códigos nacionais de boas práticas e ainda o procedimento de recurso em caso de não aprovação ou rejeição de produtos [17].

Esta legislação base estabelece os pilares da legislação alimentar na comunidade europeia mas não define quais os alimentos e géneros alimentícios sujeitos a controlo nem os critérios para aceitação destes produtos. Houve portanto a necessidade de se definirem critérios microbiológicos.

## **2.2. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS**

Os critérios microbiológicos “definem a aceitabilidade de um produto ou de um lote alimentar, baseado na ausência ou presença, ou número de microrganismos incluindo parasitas, e/ou quantidade de toxinas/metabolitos, por unidade de massa, volume, área ou lote” [18, 19].

Os critérios microbiológicos podem ser usados com diferentes objectivos e por diferentes intervenientes da indústria. Podem ser utilizados pelos operadores alimentares e pelos organismos oficiais, para avaliar o correcto funcionamento de um sistema de gestão de segurança alimentar, nomeadamente as boas práticas alimentares e implementação do HACCP. Os critérios microbiológicos são usados normalmente para avaliar microbiologicamente o estado dos alimentos em qualquer ponto da cadeia de produção alimentar, quer sejam produtos crus, ingredientes ou produtos finais, comparando a frequência e/ou nível de microrganismos patogénicos com um limite específico para aquele alimento/microrganismo patogénico. Por outras palavras, os critérios microbiológicos ajudam a definir se o lote de alimentos é aceitável ou não aceitável [10, 19-21].

É importante entender que os critérios microbiológicos por si só não são suficientes para garantir a segurança do sistema de gestão de segurança alimentar. Estes critérios devem ser usados em combinação com as boas práticas de higiene e com a implementação de HACCP [20].

Os critérios microbiológicos consistem:

- Numa indicação dos microrganismos em causa, das suas toxinas e metabolitos e a razão para a sua análise;
- Nos métodos usados para a detecção e/ou quantificação;
- No plano que define o número de amostras a serem analisadas e o tamanho da unidade analítica;
- Nos limites microbiológicos considerados adequados para um par alimento/microrganismo patogénico num determinado passo da cadeia;
- No número de unidades analíticas que devem cumprir os limites [18, 21].

A escolha dos critérios microbiológicos e a consequente interpretação do estado dos alimentos está dependente do tipo de alimento, dos ingredientes usados e do estado dos mesmos (crus ou cozinhados), do tipo de processamento a que os alimentos estão sujeitos, do nível de manuseamento após processamento, do tipo de embalagem e do processo de distribuição e armazenamento do produto final [22].

Existem 3 classes de critérios microbiológicos:

Leis e Regulamentos – critérios microbiológicos existentes em legislações e regulamentos comunitários. O seu cumprimento é obrigatório, sujeito a monitorização por parte de organismos oficiais e a falha no cumprimento pode levar a consequências para os operadores da indústria alimentar [19, 21, 23].

Especificações - critérios microbiológicos definidos como acordo contratual em trocas comerciais. Define os requisitos de qualidade e segurança a seguir pelos produtores. A falha neste acordo pode levar à rejeição do produto por parte do comprador ou a uma descida do valor de compra do produto [19, 21, 23].

Os critérios microbiológicos presentes em especificações são variáveis conforme operador, contrato, país, etc.

Valores Guia - critérios microbiológicos que ajudam a indústria e restantes operadores a definir limites aceitáveis ou não aceitáveis dos produtos em produção. São usados pelos operadores alimentares para assegurarem a qualidade dos seus produtos e dos processos de gestão de segurança alimentar e pelos organismos oficiais nas verificações. São aplicados a produtos em fase de processo industrial ou em comercialização e qualquer falha no cumprimento destes valores deve ser investigada [3, 19, 21, 23].

### **2.2.1. Legislação aplicável a critérios microbiológicos**

Em 2005 saiu o regulamento (EC) No 2073/2005, que define os critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios, estabelece critérios microbiológicos para certos microrganismos e as regras a serem implementadas pelos operadores alimentares que cumpram as regras de higiene referidas no artigo 4 do regulamento (EC) No 852/2004 [24]. Prevê ainda que os operadores das empresas do sector alimentar assegurem que os géneros alimentícios cumprem os critérios microbiológicos pertinentes estabelecidos no anexo I do referido regulamento. Este regulamento sofreu alterações/adendas pelos regulamentos (EC) No 1441/2007, No 365/2010 e No 1086/2011 [25-27].

Outros países como Brasil, Peru, Guatemala, El Salvador, Nicarágua, Honduras e Costa Rica (estes cinco últimos utilizando um guia único) optaram por estabelecer critérios microbiológicos com carácter legislativo, para uma grande variedade de alimentos, incluindo alimentos prontos a comer. A Espanha, para além de seguir o regulamento comunitário, estabeleceu legislação aplicável a critérios microbiológicos para alimentos prontos a comer. No Canadá, por exemplo, foi publicado um guia misto [28-32].

### **2.2.2. Valores Guia**

Os valores guia aplicam-se a alimentos prontos a comer em qualquer ponto da cadeia de retalho, distribuição e comercialização e não servem para substituir os critérios presentes nos regulamentos, mas para complementar a informação inexistente, nomeadamente no que diz respeito a alimentos prontos a comer. É necessário ter atenção para não se interpretarem valores guia quando existem critérios microbiológicos legais. Ao contrário dos critérios legais, os valores guia não têm nenhum plano de amostragem associado, consistindo em amostras simples, nem têm qualquer estatuto legal, constituindo linhas de orientação [20, 22, 33, 34].

Alimentos prontos-a-comer são aqueles consumidos no mesmo estado em que são distribuídos e vendidos e que não incluem processamento pelo consumidor. Podem ser crus, cozinhados, quentes ou aquecidos e podem ser consumidos sem mais aquecimento [22, 33]. Existe uma grande variedade de alimentos prontos a comer, que podem incluir ou não, ingredientes cozinhados. Devido à variedade existente, a interpretação dos resultados deve ter em conta o método de processamento e os componentes individuais do alimento, bem como a susceptibilidade de alguns alimentos para suportar crescimento de microrganismos patogénicos [22].

Neste momento, em Portugal e no resto do mundo há uma grande preocupação com a implementação dos sistemas de HACCP, nomeadamente em restauração, cafés, pastelarias, etc.

Os critérios microbiológicos presentes no regulamento (EC) No 2073/2005, alterado pelos regulamentos (EC) No 1441/2007, No 365/2010 e No 1086/2011, incluem limites microbiológicos para apenas algumas combinações alimentos-microrganismo patogénicos e para poucos alimentos prontos a comer.

Em Portugal, de modo a completar os critérios microbiológicos existentes nos regulamentos, no que diz respeito a alimentos prontos a comer, foi publicado o Guia do INSA [3].

Tendo em conta as limitações dos regulamentos, procurámos verificar se, em termos geográficos globais, os valores guias existentes em guias publicados por diferentes países tinham um conteúdo muito diferente dos valores guias publicados pelo INSA, que sugerisse preocupações diferentes com determinados microrganismos ou grupos de microrganismos e que pudessem levar a um questionamento dos nossos valores guias ou a alargar esses valores. É de referir que em caso de exportação os valores que são críticos são os da legislação.

Procurámos assim, investigar que outros valores guias existem no resto do mundo e em que medida estes valores são semelhantes. Nos Anexos 1 a 5, são apresentadas tabelas que comparam os critérios entre os valores guias para Portugal e para outros países, como Reino Unido, Hong Kong e Nova Zelândia/Austrália [20, 22, 33].

Os guias encontram-se divididos em microrganismos indicadores, microrganismos patogénicos e microrganismos totais a 30°C. Os microrganismos indicadores, referidos no Anexo 1, reflectem a qualidade higiénica dos alimentos e a presença de um grande número destes microrganismos pode ser indicador de más práticas e de uma maior probabilidade de existência de microrganismos patogénicos. Os microrganismos patogénicos, presentes no Anexo 2, são microrganismos capazes de provocar doenças de origem alimentar. Os microrganismos totais a 30°C, referidos nos Anexos 3, 4 e 5, são usados como indicação geral da qualidade dos alimentos [20, 33].

De uma forma geral, comparando os valores guias, constatámos que os intervalos dos critérios microbiológicos são bastante semelhantes entre os vários países. No entanto verificam-se diferenças em alguns aspectos que iremos referir a seguir.

Quanto a *Escherichia coli*, em Portugal existe uma diferenciação nos tipos de alimentos, sendo que para os alimentos do tipo 1 e 2 (ver Anexo 3 para classificação dos alimentos para Portugal), os intervalos são bastante mais restritos do que nos restantes países. Nos outros guias, a presença da *E. coli* não é diferenciada com o tipo de alimento.

Apenas nos guias do Reino Unido e da Nova Zelândia aparece referência à pesquisa de Enterobacteriaceae como grupo indicador e, nestes dois guias, os critérios microbiológicos são semelhantes. Em ambos os guias é feita a ressalva que as Enterobacteriaceae estão presentes em alimentos crus. No guia da Nova Zelândia é mesmo referido que é inapropriado pesquisar este grupo em alimentos prontos a comer contendo ingredientes crus como frutos e vegetais [22].

A importância da pesquisa de *Listeria* spp. apenas é reconhecida em Portugal e no Reino Unido, com critérios semelhantes.

A pesquisa de *E. coli* O157 e outras *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) e de *Vibrio cholerae* apenas é tida em conta no Reino Unido e em Hong Kong.

Relativamente a *Vibrio parahaemolyticus*, enquanto que em Portugal um alimento apenas é considerado satisfatório, quando o microrganismo está ausente em 25g, nos outros

países são satisfatórios valores do microrganismo entre 3 e 20 ufc/g e considerados aceitáveis até 100 ufc/g.

Quanto a *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos coagulase positivos, temos os critérios mais restritos em Portugal. Apenas são aceites valores inferiores a 100 ufc/g, não existindo nenhum intervalo aceitável. No Reino Unido e Hong Kong valores inferiores a 20 são satisfatórios, enquanto que na Nova Zelândia são satisfatórios valores inferiores a 100 ufc/g. O nível aceitável para estas bactérias é muito diferente entre os vários guias podendo ir até 100,  $10^3$  e  $10^4$  ufc/g.

Quanto à pesquisa/quantificação de *Listeria monocytogenes*, existe um panorama parecido em todos os guias, excepto no do Reino Unido que considera satisfatório o produto com presença da bactéria até 10 ufc/g. No guia de Hong Kong é feita a diferenciação entre alimentos refrigerados e para lactentes onde a ausência em 25 g é considerada satisfatória e os restantes alimentos onde é aceite a presença da bactéria até 20 ufc/g.

Analisando os critérios microbiológicos para os microrganismos totais nos vários guias (Anexos 3, 4 e 5), a principal diferença constatada deve-se às categorias existentes para os vários alimentos. Enquanto que para Portugal e Nova Zelândia apenas se dividem os alimentos/processamento em 3 categorias, nos guias de Hong Kong dividem-se em 5 categorias, que é feita conforme o tipo de alimento/processamento de uma forma mais explícita. Por último o Reino Unido faz a separação em 13 categorias, sendo o mais completo de todos, tendo mesmo em conta os vários tipos de culinária presentes no país, nomeadamente de influência indiana. De referir que neste guia a quantificação de microrganismos totais é feita dando muito valor ao tipo de alimentos e ingredientes existente, bem como ao processamento dos mesmos. Em todos os guias excepto o português, não é considerada aplicável a pesquisa de microrganismos totais em algumas categorias de alimentos, nomeadamente alimentos com frutas, vegetais frescos e alimentos fermentados.

De um modo geral, analisando a Tabela 1, constata-se que em Portugal, ao contrário dos restantes países, se aconselha a pesquisa de coliformes, bolores, leveduras, anaeróbios sulfito redutores como organismos indicadores e de *Yersinia enterocolitica* como microrganismo patogénico.

No guia HPA, do Reino Unido, a análise das Enterobacteriaceae veio substituir a análise dos coliformes, que eram usados tradicionalmente como indicadores de higiene. Os meios que são utilizados para análise de coliformes e Enterobacteriaceae, segundo as normas ISO, são o 'violet red bile lactose agar' (VRBL) e o 'violet red bile glucose agar' (VRBG), respectivamente, que diferem unicamente na fonte de carbono. Os coliformes são bactérias gram-negativas de origem entérica, muitas vezes restritos aos que fermentam a lactose muito rapidamente e que originam colónias púrpura. Os coliformes não produtores de lactose ou os que produzem muito lentamente, como *Escherichia* e *Enterobacter*, originam colónias mais pálidas ou esverdeadas. Na análise de alimentos é actualmente mais recomendada a análise de Enterobacteriaceae, que fermentam a glucose para ácido e/ou gás [34]. Este grupo, taxonomicamente bem definido, inclui os coliformes, salmonelas e shigelas, que não

fermentam a lactose e *E. coli* enterotoxigénicas. Nesta análise são também detectados outros microrganismos como *Klebsiella* e *Citrobacter*, que são mais resistentes ao calor que outros coliformes e por isso são bons indicadores de falhas nos processos que usam pouco calor. É possível assim, através da análise das Enterobacteriaceae, uma detecção mais abrangente do que quando comparado com a análise de coliformes [34].

**Tabela 1.** Comparação dos microrganismos pesquisados nos guias referenciados [3, 20, 22, 33].

	<b>Portugal</b> <b>INSA</b> <b>2005</b>	<b>Reino Unido</b> <b>HPA</b> <b>2009</b>	<b>Hong Kong</b> <b>CFS</b> <b>2007</b>	<b>Nova Zelândia</b> <b>NSW</b> <b>2009</b>
<b>Microrganismos Totais</b>	x 3 categorias	x 13 categorias	x 5 categorias	x 3 categorias
<b>Microrganismos Indicadores</b>				
<b>Bolores</b>	x			
<b>Leveduras</b>	x			
<b>Coliformes</b>	x			
<b>Enterobacteriaceae</b>		x		x
<b><i>E. coli</i> (Total)</b>	x	x	x	x
<b><i>Listeria</i> spp.</b>	x	x		
<b>Anaeróbios sulfito redutores</b>	x			
<b>Microrganismos patogénicos</b>				
<b>Estafilococos coagulase positiva</b>	x	x	x	x
<b><i>E. coli</i> O157</b>		x	x	
<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	x	x	x	x
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	x	x	x	x
<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>	x	x	x	x
<b><i>Vibrio cholerae</i></b>		x	x	
<b><i>Campylobacter</i> spp.</b>	x	x	x	x
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	x	x	x	x
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	x	x	x	x
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	x			
<b><i>Shigella</i> spp.</b>		x		

A detecção de *Yersinia enterocolitica* pode-se justificar pelo grande consumo de carne de porco no nosso país e por ser um dos microrganismos presentes na directiva 2003/99/EC para monitorização de zoonoses. A não inclusão de detecção de *E. coli* O157 no guia prende-se com o facto de o guia português ser o mais antigo.

No regulamento (EC) No 2073/2005 é mencionado que para *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* não existem dados científicos para suportar critérios microbiológicos legais

para marisco, contudo é recomendado que sejam estabelecidos nos códigos de práticas, como os guias. No guia do INSA, como já foi referido, existem valores guias para *Vibrio parahaemolyticus*, embora estes sejam de presença/ausência, enquanto que os outros guias optaram por estabelecer critérios quantitativos. A análise de bolores e leveduras só é sugerida no guia português. Os bolores e leveduras podem desempenhar um papel importante na deterioração dos alimentos e o seu perigo para a saúde advém da produção de micotoxinas por alguns bolores. O regulamento (EC) No 1881/2006, e emendas posteriores, estabelece níveis máximos de contaminação para micotoxinas. A análise de micotoxinas é feita por métodos com fundamentos químicos, que não estão no âmbito desta tese. É possível que estes microrganismos não sejam referidos nos outros guias analisados, nomeadamente no guia do HPA, pela existência de legislação para as micotoxinas, tendo em conta a importância destas na segurança alimentar.

Os organismos indicadores apresentados nos guias são importantes no cumprimento do sistema HACCP. Como o próprio nome diz são indicadores do estado de higiene da produção e de todo o sistema. Servem para estabelecer uma linha base que serve de alerta em caso de ocorrer um aumento na contaminação do sistema. Níveis elevados destes organismos podem ser um indicador que as condições de higiene não são suficientes e que existe uma grande probabilidade de surgirem microrganismos patogénicos.

Em todos os guias, excepto no guia português, é feita de uma maneira mais ou menos completa a descrição dos tipos de microrganismos indicadores e microrganismos patogénicos.

No guia inglês é feita também a descrição dos alimentos em que podem existir esses microrganismos e quais os sintomas que causam. Esta introdução aos microrganismos revela que existe uma grande preocupação de prestar um bom serviço de informação sobre todos os microrganismos a pesquisar, de modo a que o guia seja facilmente percebido e para que todos os intervenientes da indústria alimentar que utilizem os guias o possam fazer de uma maneira mais consciente, correcta e para melhor interpretar os critérios microbiológicos. Por outro lado, revela um acompanhamento das preocupações nesta área e das tendências alimentares no país.

Recomenda-se que conforme os objectivos dos operadores alimentares e dos laboratórios, sejam analisados os guias aqui referidos para obter informações sobre critérios microbiológicos para microrganismos patogénicos que não estão presentes no guia português.

### **3. MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS E PATOGÉNICOS EMERGENTES**

#### **3.1. MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS ALIMENTARES**

Hoje em dia, mesmo com os avanços tecnológicos e científicos, as doenças causadas por microrganismos patogénicos alimentares têm um peso desconhecido. Em 2005 foi estimado pela Organização Mundial de Saúde que 1,8 milhões de pessoas morreram por

doenças diarreicas, sendo que muitos destes casos foram atribuídos a contaminação de água e alimentos [35].

A doença de origem alimentar é definida pela OMS como “a doença de natureza infecciosa ou tóxica causada por, ou o que se pensa ser causada por, consumo de alimentos ou água” [36, 37].

A origem infecciosa destas doenças ocorre quando são ingeridos microrganismos patogénicos juntamente com alimentos ou água, que sobrevivem à acidez do estômago e no trânsito intestinal, se multiplicam e originam os sintomas gastrointestinais, característicos destas doenças. Se os microrganismos patogénicos não se confinarem ao tracto intestinal e invadirem outros órgãos podem causar outros sintomas clínicos para além dos sintomas gastrointestinais, como é o caso de *Listeria monocytogenes*. Alguns microrganismos patogénicos podem produzir toxinas, como é o caso de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* e neste caso podem ser essas toxinas a provocar sintomas nas chamadas intoxicações alimentares. O período de incubação das intoxicações alimentares é mais reduzido que as infecções alimentares porque as toxinas têm actuação imediata e podem afectar todo o organismo [36, 38].

O sucesso da doença alimentar depende de três factores: do microrganismo patogénico, da susceptibilidade da pessoa e do alimento em causa. A dose infecciosa, ou seja a quantidade do microrganismo patogénico necessário para causar doença, varia consoante o microrganismo. Por outro lado essa dose infecciosa também varia consoante a susceptibilidade da pessoa infectada, sendo que as crianças, os idosos, as pessoas mal nutridas, as pessoas com conteúdo gástrico reduzido e pessoas com o sistema imunitário comprometido estão em desvantagem comparativamente com um adulto saudável. Sabe-se também que existem alimentos que protegem os microrganismos da acidez do estômago [36].

Em países desenvolvidos as doenças de origem alimentar originam, na sua maioria, sintomas gastrointestinais desconfortáveis mas com uma ocorrência moderada e limitada no tempo. Na população geral não constituem um perigo de vida, mas em populações susceptíveis como grávidas, crianças, idosos e pessoas com sistema imunitário comprometido, podem constituir um risco mais grave. É estimado no entanto que 2 a 3% dos casos de doenças de origem alimentar desenvolvam sequelas crónicas, como doenças renais, cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicas e imunológicas [39]. Por outro lado, em países menos desenvolvidos e emergentes, em conjunto com outros factores como a subnutrição, as doenças de origem alimentar, através de sintomas de diarreia, constituem uma séria ameaça de saúde pública, podendo levar à morte, principalmente de crianças [36].

Embora as consequências sejam mais graves em países em desenvolvimento, as doenças de origem alimentar não são um problema exclusivo destes países. Num estudo feito em 1999 nos Estados Unidos da América, foi estimado que ocorriam anualmente 76 milhões de doenças de origens alimentares, que resultaram em 325 000 hospitalizações e 5000 mortes por ano [40]. Os custos associados a estas doenças são difíceis de estimar porque têm em conta um grande número de factores como os custos dos tratamentos de saúde, a perda de

produtividade e de rendimento devido ao absentismo das pessoas afectadas, os custos de investigação dos surtos e as quebras de venda de produtos alimentares associadas à falta de confiança dos consumidores [36]. Apesar da dificuldade, os EUA estimam os custos associados a doenças de origens alimentares em 23 biliões de dólares por ano, o que constitui um montante muito elevado [39].

Os alimentos constituem um bom veículo de transmissão de microrganismos patogénicos que podem assim colonizar novos hospedeiros. O modo de cozinhar e preparar os alimentos é muito importante na transmissão dos microrganismos, sendo que o consumo de alimentos crus e mal cozinhados, como a carne e o peixe, pode aumentar o risco de contaminação. A transmissão de microrganismos patogénicos pode ocorrer em produtos frescos que são lavados com águas contaminadas e que depois são consumidos crus ou cozinhados a baixas temperaturas para manter os nutrientes e sabor dos alimentos. Por outro lado, existem alimentos naturalmente perigosos, como os bivalves que funcionam como filtros, concentrando microrganismos patogénicos. A água também constitui um elemento importante na transmissão destes microrganismos, quer por consumo directo quer pelo uso de água contaminada para uso pessoal, na indústria alimentar para irrigar culturas e do próprio uso de águas contaminadas no processamento e preparação dos alimentos [41]. Durante e após o processamento dos alimentos também existem práticas de risco como refrigeração e armazenamento insuficientes ou não adequados, contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos cozinhados, higiene deficiente dos manipuladores e das instalações [37].

Os microrganismos patogénicos alimentares capazes de provocar doenças de origem alimentar incluem bactérias, vírus, parasitas, dinoflagelados marinhos produtores de toxinas que usam bivalves e peixes como vectores, e cianobactérias em águas doces<sup>1</sup> [37, 38]. Alguns destes microrganismos necessitam do Homem como parte do seu ciclo de vida mas a maioria tem reservatórios principais em animais ou no ambiente, pelo que o Homem é apenas uma vítima da transmissão. Muitos dos microrganismos usam os alimentos como a única via de transmissão, enquanto que outros possuem outros modos também [38]. A maioria dos microrganismos patogénicos alimentares têm origem zoonótica, ou seja, usam os animais como o seu reservatório e são transmitidos ao Homem directamente através do contacto com animais, solo, ervas ou fezes contaminadas ou indirectamente através da ingestão de água e alimentos contaminados [37, 41, 42].

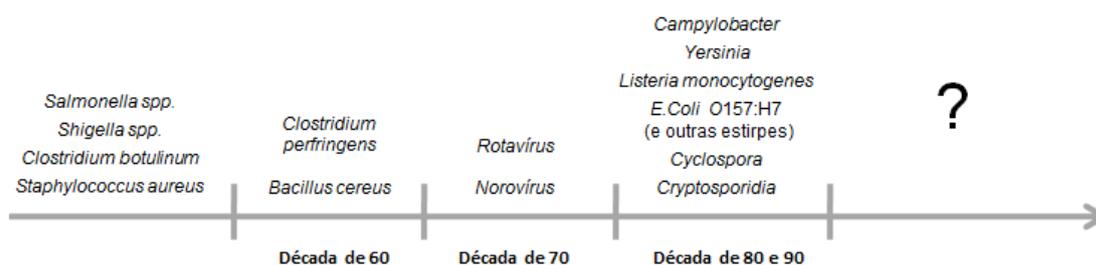
As origens das doenças de origem alimentar não permanecem imutáveis ao longo do tempo, ou seja, estas doenças não têm sido causadas sempre pelos mesmos microrganismos, porque existem microrganismos patogénicos conhecidos que podem ser controlados, novos microrganismos patogénicos irão ser descobertos, outros que eram conhecidos como microrganismo patogénicos mas que apenas agora serão reconhecidos como tendo origem alimentar. Por outro lado, existem estirpes de microrganismos que emergem através de mutação ou que evoluem por adquirirem novos factores de virulência e podem surgir novos microrganismos patogénicos originados de outras tecnologias e ecologias, que passam a

---

<sup>1</sup> Embora não sendo microrganismos, os priões também podem provocar doenças de origem alimentar.

colonizar os alimentos, como por exemplo alimentos frescos produzidos num país menos desenvolvido. O aumento da resistência antimicrobiana é também um factor muito importante a ter em conta [38, 43].

É expectável que a lista de microrganismos patogénicos alimentares aumente, à medida que novos microrganismos vão sendo identificados, e é muito provável que estes sejam de origem zoonótica. À medida que os sistemas de detecção dos microrganismos patogénicos, principalmente de vírus e parasitas, e as ferramentas de diagnósticos melhoram é natural que se comece a notar um aumento dos relatos de ocorrência desses microrganismos [43].



**Figura 1.** Evolução do reconhecimento dos microrganismos ao longo das décadas: maiores agentes de doenças infecciosas intestinais [43, 44].

Entre os microrganismos patogénicos alimentares existentes, as bactérias têm sido as mais investigadas e monitorizadas ao longo do tempo, como se pode verificar pela Figura 1. A partir da década de 80 e 90 do século passado, *E. coli*, *Campylobacter* e *Salmonella* sp. têm sido importantes ao nível da monitorização e vigilância, mas nos últimos anos *Listeria monocytogenes* tem subido de importância. No entanto, apesar de toda a atenção dada a estas bactérias, nomeadamente em estratégias de prevenção, elas continuam presentes, como exemplo de microrganismos patogénicos persistentes. Os microrganismos patogénicos estão sempre a evoluir de modo a ocuparem novas oportunidades de nicho, como por exemplo, *Salmonella* sp. que sempre foi associada a alimentos como ovos, carnes, leite, tem surgido nos últimos anos associada a surtos importantes de alimentos frescos como vegetais [43].

Os vírus têm ganho importância no panorama internacional, nomeadamente com a emergência do vírus SARS e do vírus da gripe das aves, ambos de origem animal, que contaminaram humanos através dos alimentos e do contacto com os animais.

Embora não haja consenso entre os virologistas sobre se os alimentos possibilitarão a entrada de novas doenças virais na população humana, existe consenso que novos vírus vão surgir e que vírus antigos possam evoluir para novas formas [43].

É importante perceber que os vírus, ao contrário das bactérias, não se multiplicam nos alimentos porque necessitam de células vivas para se replicarem. Os vírus são muito infecciosos, necessitando de poucas partículas infecciosas para causarem infecção e depositando grandes cargas virais nas fezes dos indivíduos infectados, aumentando assim a transmissão entre pessoas e podendo mascarar a origem alimentar da infecção [43].

No entanto apesar desse risco, e de um ponto de vista laboratorial, o controlo de qualidade alimentar microbiológico existente ainda reside essencialmente em análises bacteriológicas, nomeadamente através de bactérias patogénicas ou indicadoras de contaminação fecal. É importante ter a noção que os critérios microbiológicos presentes nos regulamentos e os critérios microbiológicos dos guias são insuficientes para proteger os alimentos das infecções virais, pois existem casos de alimentos que passaram o controlo microbiológico de rotina mas que mostraram estar contaminados com grandes cargas virais patogénicas. É importante estabelecer estratégias de prevenção da contaminação dos alimentos, nomeadamente antes de chegar à produção alimentar, de modo a que se possa proteger os alimentos tanto das infecções bacterianas, como das virais [43].

Ao contrário dos sistemas de vigilância existentes para bactérias, poucos países têm sistema de vigilância sistemática para os vírus de origem alimentar e para além disso temos o caso de vírus como o da Hepatite A e o Enterovírus que muitas vezes não são reportados como tendo origem alimentar. Por outro lado, os sistemas de detecção disponíveis para vírus, que dependem de técnicas moleculares e que não se encontram disponíveis nos laboratórios de rotina, levam a um grande número de casos subestimados e sub-reportados [43].

Os parasitas são organismos que estabelecem relações de parasitismo com hospedeiros, com benefícios para o parasita a nível do crescimento e da reprodução mas com prejuízo para o hospedeiro. Os protozoários, que se reproduzem no interior do hospedeiro mas que conseguem sobreviver fora deste, e os helmintas, cujas larvas podem atingir vários metros de comprimento, são os parasitas que podem causar infecções alimentares. Das 300 espécies de helmintas e 70 de protozoários que usam o Homem como hospedeiro apenas 100 têm origem alimentar [43, 44].

As infecções por parasitas podem ocorrer através da via fecal-oral, por ingestão directa de alimentos contaminados ou de estágios do parasita, como os ovos, presentes no ambiente. A contaminação dos alimentos pode ocorrer através das fezes, do solo, da água de irrigação, esgotos e manuseamento incorrecto de carne contaminada. A contaminação por parasitas ocorre muitas vezes porque o próprio produto animal (peixe ou carne) está contaminado através da infecção por parasitas dos animais. Os efeitos provocados por estas infecções são muito variados e podem ir de assintómicos a doenças crónicas. Parasitas como toxoplasma, giardia e cisticercos afectam milhares de pessoas em todo o mundo e as infecções provocadas podem ter consequências fatais [43, 44].

Os parasitas não se replicam fora do hospedeiro mas têm estágios resistentes ao ambiente que permitem a sua sobrevivência fora daquele, nomeadamente são resistentes a desinfecções. São normalmente resistentes aos antibióticos usuais e não precisam de grandes doses infecciosas para causar doença. Embora o risco de contrair uma infecção por parasitas num país desenvolvido seja inferior ao risco presente em países em desenvolvimento, com sistemas sanitários deficientes, problemas de alimentação, falta de condições de saúde, população muito numerosa, temos que ter em conta que os parasitas têm uma distribuição mundial [43].

Tal como nos vírus, as doenças alimentares causadas por parasitas estão largamente subestimadas, devido à falta de informação da população em geral e dos prestadores de saúde, à falta de investigação na área, aos sintomas nulos ou moderados, aos períodos de incubação longos e devido à falta ou insuficiência de métodos de detecção laboratoriais. Muitas vezes os surtos alimentares causados por parasitas ou não são reconhecidos ou não são identificados [43].

No Anexo 6 indicam-se, para os principais microrganismos alimentares, os alimentos associados, período de incubação, dose infecciosa, duração e sintomas da doença.

### *3.2. FACTORES QUE INFLUENCIAM A EMERGÊNCIA E O AUMENTO DE INFECÇÕES ALIMENTARES*

Um risco emergente ao ser humano, à saúde de animal e/ou planta é entendido como um risco que resulta de um perigo recentemente identificado para o qual uma exposição significativa pode ocorrer ou a partir de uma inesperada, nova ou significativo aumento de exposição e/ou susceptibilidade a um risco conhecido [45].

De uma forma geral, os factores que influenciam a emergência de doenças infecciosas são as alterações climáticas, alterações ecológicas e no uso da terra, alterações no comportamento e demografia humana, aumento de viagens internacionais, tecnologia e indústria, adaptação e alterações microbiológicas, desenvolvimento económico e quebras nas medidas de segurança pública. Outro factor que foi relacionado com a emergência foi o estado zoonótico, porque quase 75% dos microrganismos patogénicos emergentes são zoonóticos e as zoonoses são consideradas duplamente mais emergentes que as não zoonoses [39, 44, 46]. A emergência por outro lado é dependente de actividade humana e das medidas que a sociedade estabelece em termos de vigilância, prevenção, educação e monitorização [46].

Na Figura 2 esquematizam-se os principais factores que influenciam a emergência e o aumento das infecções alimentares, sendo que cada factor será discutido.



**Figura 2.** Principais factores que influenciam a emergência de infeções alimentares

As alterações climáticas favorecem a distribuição de hospedeiros internacionais, pois o aquecimento global pode alterar a dinâmica da transmissão de parasitas zoonóticos em áreas endémicas e permitir que estes se possam transmitir em zonas onde não existiam previamente [37, 43, 44]. Por outro lado, as alterações climáticas que são esperadas piorar nas próximas décadas, podem levar a um aumento da presença de contaminantes biológicos no ambiente marinho (toxinas produzidas por algas), aumento das populações de microrganismos patogénicos ou deslocação de microrganismos para zonas de cultivo por efeito de cheias [47].

As populações de risco são mais susceptíveis de contraírem infeções alimentares e por outro lado terem consequências mais graves do que a população saudável. As populações de risco são as crianças, grávidas, pessoas subnutridas, idosos e pessoas com o sistema imunitário comprometido. Constata-se que existe um aumento na população susceptível às doenças de origem alimentar, consequência de alterações demográficas como o aumento da população idosa (que já se verifica em Portugal) e o aumento das pessoas com o sistema imunitário comprometido devido a infeções como o HIV ou em resultado de tratamentos médicos [36, 43, 44, 46, 48, 49].

A globalização levou a um aumento do movimento internacional de pessoas e alimentos. Por um lado, o movimento de pessoas pode traduzir-se em viagens turísticas onde o risco de contrair infeções alimentares é maior, principalmente se for para países menos desenvolvidos, não só porque as questões de segurança alimentar ainda não estão nas agendas das autoridades mas também porque a susceptibilidade dos hospedeiros a estirpes diferentes com que deparam diariamente pode ser diferente. Por outro lado, a globalização da distribuição de alimentos levou ao aumento do mercado global de vegetais, frutas, carne, alimentos étnicos e mesmo de animais. Face a uma procura cada vez mais exigente dos

consumidores por alimentos mais baratos, mas disponíveis todo o ano, e mesmo de produtos exóticos, houve um aumento na produção a nível global. Tendências culinárias, como o consumo de alimentos crus, por exemplo carne e peixe cru ou pouco cozinhado, associados a culturas e países específicos, ficaram disponíveis em todo o mundo, o que levou a um aumento de infecções alimentares, que estavam confinadas a certas áreas [36, 41, 44, 46].

O aumento da importação de produtos frescos, peixe e marisco também pode levar a uma dispersão dos microrganismos patogénicos, principalmente se forem oriundos de países em que as práticas agrícolas e de segurança alimentar sejam inferiores [43, 44, 49].

Para satisfazer as necessidades das populações em crescimento e ter disponíveis produtos todo o ano foi necessário intensificar o processo de produção animal e vegetal [48, 49]. Por outro lado existe uma preocupação crescente com o ambiente, que leva a uma prática de agricultura mais orgânica e sustentável, que pode trazer consequências ao nível da segurança alimentar, nomeadamente devido à utilização de estrume [43, 44, 48].

O aumento da industrialização originou uma cadeia alimentar mais longa e complexa que aumenta também o risco de contaminação. O problema da contaminação a nível industrial quer por manuseamento, contaminação cruzada, quer por contaminação de superfícies por bactérias formadoras de biofilmes como *Listeria monocytogenes* e cuja eliminação se torna difícil, quer por contaminação de ingredientes, pode levar a contaminação de lotes inteiros do produto final que serão distribuídos por todo o mundo em pouco tempo [36, 49].

A melhoria nos sistemas de logística e transporte dos produtos (como é o caso dos embalagens de vácuo que permitem que os alimentos se mantenham a temperaturas de refrigeração durante mais tempo, permitindo assim que os microrganismos patogénicos também se mantenham refrigerados) permite também que os microrganismos sobrevivam até chegarem ao consumidor [43, 44].

Os hábitos sociais, demográficos e económicos, também podem influenciar o aumento de infecções alimentares [37]. O rápido crescimento da população, nomeadamente em países em desenvolvimento onde o crescimento populacional e habitacional não acompanhou o desenvolvimento de infra-estruturas básicas como o saneamento, aumenta o risco de contaminação de alimentos e de água. Por outro lado, as alterações demográficas que progridem no sentido de populações mais envelhecidas levam a um aumento de populações susceptíveis a um risco de infecção alimentar, como já foi supra referido [36, 43, 44].

As alterações sociais e do estilo de vida das populações levaram as pessoas a fazer mais refeições fora de casa ou a comprar refeições prontas a consumir [36, 43, 44, 46]. As refeições prontas a comer e refeições refrigeradas poderão levar a aumento da probabilidade de infecção, pois estes alimentos são sujeitos a um maior manuseamento durante a produção. Por outro lado, existem bactérias como *Listeria monocytogenes*, que sobrevivem a baixas temperaturas [49]. Segundo um estudo feito pelo CDC de 1998 a 2002 o risco de contrair uma infecção alimentar em refeições fora de casa é maior do que para refeições preparadas em casa [49].

A capacidade dos microrganismos para se adaptarem a novos ambientes, novos nichos e condições desfavoráveis pode dever-se a variabilidade genética. A emergência de novos microrganismos patogénicos pode ser perigosa, principalmente se estes evoluírem ou sofrerem mutações para variantes mais virulentas ou resistentes a antimicrobianos [49]. O desenvolvimento de resistência antimicrobiana associada ao uso indiferente e intenso de antibióticos, nomeadamente na promoção do crescimento dos animais e no uso em simultâneo de antibióticos em animais e humanos, levou à emergência de bactérias resistentes que poderá trazer consequências graves ao nível da saúde pública [37, 43, 46, 50].

Os alimentos podem conter bactérias patogénicas resistentes a antibióticos que provocam infecção directamente por ingestão do alimento. Por outro lado, é possível a transferência de genes de resistência para bactérias patogénicas através de bactérias comensais como *E. coli* ou *Enterococcus* spp. Os determinantes de resistência podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias de diferentes animais e por variados meios, incluindo a comida [43].

Para que haja um maior controlo e prevenção da resistência antimicrobiana deve-se ter em conta a monitorização da resistência antimicrobiana e o uso dos antibióticos em animais e no Homem [42, 43]. Enquanto que na União Europeia os promotores de crescimento foram banidos, existem países onde essa situação permanece igual [43].

É sempre difícil prever o futuro e, face à emergência de microrganismos patogénicos alimentares que será possível pelos factores descritos acima, a questão a colocar é que microrganismos poderão emergir e para que é que os laboratórios de microbiologia se devem preparar?

Embora não estejam presentes nos regulamentos comunitários, já existem procedimentos laboratoriais descritos em normas ISO para *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157, *Shigella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*.

Para além destas normas ISO publicadas, neste momento existem outros microrganismos patogénicos que estão a ser considerados para desenvolvimento de novas normas ISO, estando já em desenvolvimento as normas para a detecção de neurotoxinas produzidas por *Clostridium botulinum*, *E. coli* produtora de shiga-toxina e determinação dos serogrupos O157, O111, O26, O103 e O145 [51, 52].

Quanto à detecção de vírus, estão a ser desenvolvidas normas para detecção de norovírus e hepatite A, por PCR [51, 52]. Também já foi iniciado o trabalho para detecção dos parasitas *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Trichinella* [51, 52].

Isto revela uma preocupação com a emergência de microrganismos a nível internacional e poderá ser uma indicação de métodos a implementar pelos laboratórios (ver Anexo 6 – microrganismos patogénicos alimentares).

A emergência de microrganismos patogénicos tem sido alvo de muitos estudos, como já foi referido e tenta-se perceber que microrganismos poderão causar problemas no futuro. Para além dos microrganismos referidos e aqueles do Anexo 6, existem outros que são alvo de referência e estudos, como o caso de *Aeromonas* spp., que inclusive pertence a uma lista de

contaminantes candidatos da EPA (Environment Protection Agency) para regulamentação futura e *Enterococcus* spp. entre outros.

## 4. LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

### 4.1. QUE MÉTODOS ESCOLHER?

Desde sempre que a preferência dos laboratórios, que realizam análises de rotina para cumprimento da legislação nacional ou comunitária de segurança alimentar, se dirigiu para métodos normalizados. As autoridades nacionais e internacionais também o preferem porque os resultados são comparáveis, os laboratórios não têm necessidade de validar os métodos e a avaliação dos laboratórios por ensaios interlaboratoriais é muito mais simples. Esses métodos normalizados começaram por ser nacionais, tendo existido sempre métodos internacionais, como métodos ISO ou do Codex Alimentarius. As normas de um país podiam ser usadas em laboratórios de outros países, por exemplo, normas francesas usadas por laboratórios em Portugal. Alguns países como o caso de Portugal, também adoptavam muitas vezes normas de outros países como normas nacionais. No que diz respeito aos métodos microbiológicos, a publicação da norma ISO 7218/2007, norma horizontal para a microbiologia alimentar, permitiu que os laboratórios, desde que tenham um sistema de qualidade implementado, possam utilizar uma só placa por diluição (métodos microbiológicos clássicos). Ou seja, passou a permitir que mesmo que um laboratório usasse uma norma ISO em que era mencionada a necessidade de usar placas em duplicado, poderia utilizar unicamente uma placa. Assim, a maioria dos países retiraram as suas normas nacionais e todos os laboratórios foram encorajados a usar normas ISO. No caso de Portugal, muitas normas eram baseadas nas normas francesas e como a França retirou muitas das normas de microbiologia alimentar após a saída da ISO 72018, as normas portuguesas deixaram de ter suporte técnico. Embora as normas portuguesas não tenham sido oficialmente retiradas, os laboratórios foram gradualmente mudando para as normas ISO quando existia uma para o método que pretendiam utilizar. Neste momento, e para a maioria dos métodos microbiológicos que são utilizados em rotina pelos laboratórios de microbiologia alimentar acreditados, os métodos utilizados são métodos ISO. Este facto facilitou a comparabilidade de resultados. Por outro lado, no regulamento (CE) No 2073/2005 é referido o uso de normas ISO, o que leva a um reconhecimento internacional, pelo que as pessoas perceberam que teriam vantagens em mudar.

A área da microbiologia alimentar tem progredido muito nos últimos anos, sendo empurrada pelas inovações em áreas complementares como a biotecnologia, imunologia, informática e biologia molecular, apresentando nos dias de hoje uma grande variedade de métodos que permitem resultados rápidos, sensíveis e de fácil aplicação. Muitos desses métodos já eliminaram o passo de cultivo do organismo a detectar. No entanto, apesar da

melhoria dos laboratórios de microbiologia alimentar, estes ainda estão aquém dos laboratórios industriais e de análises clínicas no que diz respeito à automatização dos seus métodos [53].

Para além dos métodos clássicos, têm emergido métodos ditos alternativos que surgiram face à necessidade de se obterem resultados cada vez mais rápidos, sensíveis e de fácil execução, como métodos baseados em PCR, métodos imunoenzimáticos como o Vidas® ou automatizações da técnica do Número Mais Provável (NMP) como o TEMPO® [4, 52]. Por outro lado, estes métodos surgiram com o objectivo de reduzir os erros humanos, poupar tempo e custos de trabalho e para detectar baixas quantidades de microrganismos patogénicos nos alimentos, mesmo quando misturados com outros microrganismos. Deste modo, com estes novos métodos é possível uma monitorização de todo o processo de produção mais rápida e eficaz, em qualquer passo do processo [4, 52].

O regulamento (EC) No 2073/2005 refere que é aceitável o uso de métodos alternativos desde que validados pela ISO 16140/2003, ou o uso de métodos proprietários desde que certificados por uma terceira parte de acordo com a Norma ISO 16140/2003 ou outro protocolo internacional, pelo que os laboratórios podem usar esses métodos sem necessidade de validação formal, podendo decidir o que implementar [24].

É dada assim a liberdade aos laboratórios de escolherem qual o método que melhor se aplica à sua realidade, isto é, tendo em conta o número de amostras processadas diariamente, as instalações, o pessoal, o equipamento e o orçamento que têm para investir.

Muitos dos métodos alternativos já reflectem a preocupação com os microrganismos patogénicos emergentes, nomeadamente já existem métodos alternativos validados para *E. coli* O157 e *Campylobacter* [5].

Pretende-se em seguida apresentar os principais métodos usados em microbiologia alimentar, métodos convencionais ou alternativos, e as suas vantagens e desvantagens.

#### **4.1.1. Métodos Convencionais**

Os métodos clássicos ou convencionais são considerados os métodos de referência na microbiologia, pelo que todos os métodos alternativos têm de ser testados contra estes. Os métodos clássicos são baseados em preparações de diluições decimais da amostra, plaqueamento em meio sólidos e detecção/contagem de colónias de microrganismos viáveis que crescem nesses meios. Estes métodos podem passar por uma série de passos, como pré-enriquecimento, enriquecimento e cultura em meios selectivos. Depois destes passos, se aplicável, as colónias identificadas como suspeitas têm de ser sujeitas a testes bioquímicos (ex. catalase, coagulase, oxidase) e/ou serológicos para se confirmar a identificação do microrganismo [4, 54]. São métodos muito sensíveis, relativamente baratos e eficientes, permitem o isolamento de mais do que um microrganismo patogénico ou indicador e podem ser usados quer para identificação, quer para contagem de microrganismos em estudo [4].

No entanto, estes métodos são lentos, implicam um trabalho intenso como a preparação e inoculação de meios de cultura e a contagem de colónias, sendo necessário um grande treino de qualificação [4, 53, 54]. Outras desvantagens apontadas aos métodos

dependentes de cultura deve-se ao facto das células stressadas poderem não ser facilmente recuperáveis, pelo que não são detectadas em meios selectivos, o que leva a falsos negativos e à dificuldade em detectar alguns organismos com crescimento fastidioso, como *Campylobacter jejuni* [2].

#### 4.1.2. Métodos Alternativos

Os métodos alternativos, baseados em compostos cromogénicos adicionados aos meios de cultura, em PCR, em técnicas imunoenzimáticas, permitem que os laboratórios possam ter resultados mais rapidamente, com uma maior automatização, reduzindo assim a carga de trabalho envolvida, permitindo analisar mais amostras ao mesmo tempo e reduzindo o erro humano. Para além disso, é possível retirar o pessoal qualificado do trabalho mais repetitivo, de modo a que possa realizar trabalho especializado [52, 53].

No entanto, estes métodos têm reagentes caros, necessitam de investimento em equipamentos e de um maior investimento para a sua implementação. Muitos dos métodos alternativos não se aplicam a laboratórios de pequenas dimensões, que têm poucas amostras e uma rotina de trabalho pouco previsível [53].

Por outro lado, os métodos alternativos também necessitam de uma fase de pré – enriquecimento para a detecção de alguns microrganismos patogénicos, pois a sensibilidade e especificidade são baixas para detecção directa [55]. Muitas vezes os microrganismos patogénicos estão presentes em contagens baixas, pelo que precisam de ser separados da matriz alimentar e concentrados por pré-enriquecimento. Deste modo, é possível reduzir os falsos negativos, diminuir o tempo de detecção e tornar o processo mais eficiente [4].

##### 4.1.2.1. Meios de cultura cromogénicos

Os meios de cultura cromogénicos surgiram como uma alternativa aos meios de cultura convencionais e são meios muito mais específicos que estes, o que permite a redução da carga de trabalho, devido à diminuição dos testes de confirmação de colónias. Em termos genéricos, possuem na sua composição um substrato que quando se liga a uma enzima expressada por uma bactéria é quebrado, produzindo compostos coloridos. Conforme a enzima em causa, origina diferentes cores no meio, permitindo a identificação dos microrganismos [54].

Estes meios também apresentam desvantagens, são caros e são meios de cultura muito específicos, não permitindo a identificação de outros microrganismo patogénicos [54].

No entanto, neste momento são dos métodos mais usados para a identificação de *Listeria monocytogenes* (Rapid' L.mono Agar®, chromID™ Ottaviani Agosti Agar), *Salmonella* (Rapid Salmonella®) e *Escherichia coli* (Rapid E. Coli 2®, Gélase chromID™ Coli) sendo que pelo método convencional se demoram 3 a 4 dias para chegar à identificação presuntiva da espécie, enquanto que pelos meios cromogénicos essa identificação é possível após 24 horas, sendo de fácil interpretação [55].

#### 4.1.2.2. Métodos imunoenzimáticos

Estes métodos dependem da ligação específica de um antígeno a um anticorpo. Pretende-se através destes métodos determinar, quantitativa ou qualitativamente, antígenos e/ou anticorpos presentes numa amostra. A progressão destes métodos na microbiologia alimentar deve-se ao desenvolvimento de ensaios mais sensíveis, à automatização das técnicas que permitem a redução do tempo de execução de tarefas mais lentas e ao desenvolvimento de anticorpos altamente específicos [4].

O tipo de método imunoenzimático mais usado em microbiologia alimentar é o método ELISA (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima) [4, 55]. O equipamento com o nome comercial de VIDAS® tem como princípio um ensaio do tipo ELISA, que combina o princípio destes testes com a leitura de um sinal final de fluorescência e que se chama ELFA (Ensaio Fluorescente Ligado à Enzima). Este equipamento é muito usado em microbiologia para a detecção de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, *E. coli* O157 e *Campylobacter*, devido à facilidade de utilização, rastreabilidade, automatização e optimização do trabalho que permite a obtenção de resultados rápidos [56].

#### 4.1.2.3. Sistema TEMPO®

O equipamento TEMPO® é o único método automatizado validado pela AFNOR para organismos indicadores de qualidade e é baseado no método do Número Mais Provável (NMP), consistindo em 16 tubos miniatura num cartão e em meios de cultura específicos para cada microrganismo em análise. Cada cartão cobre várias diluições e é correspondente a um meio de cultura. É um equipamento que permite reduzir as tarefas e o material associado, permite a rastreabilidade de todas as etapas, é muito fácil de usar e permite uma redução do tempo para obtenção dos resultados sem necessidade de confirmação dos mesmos. Permite a contagem de indicadores de qualidade em amostras alimentares e ambientais, como contagem de Microrganismos Totais, Enterobacteriaceae, Coliformes Totais, *E.coli*, Estafilococos coagulase (+), bactérias ácido-lácticas e de bolores e leveduras [57].

#### 4.1.2.4. PCR

A PCR é uma técnica de biologia molecular usada para amplificar determinadas sequências de DNA presentes numa amostra [58]. A sua aplicação nas análises de microbiologia alimentar era, e é, óbvia uma vez que que permite detectar uma sequência de DNA de um microrganismo alvo.

O método de PCR é mais rápido, sensível e específico que os métodos de cultura, permitindo também a detecção de outras subpopulações presentes na amostra [59]. No entanto, é inibido por componentes presentes na matriz dos alimentos, altamente complexa, como compostos inibidores ou mesmo substâncias presentes nos meios selectivos como sais biliares ou acriflavina, sendo necessário assegurar que estes inibidores são removidos nos

passos de extracção de DNA e que há controlos nos ensaios que permitam evitar os falsos negativos [2, 4, 55].

As desvantagens do método de PCR devem-se à necessidade de ter pessoal especializado, instalações que permitam um fluxo do trabalho que minimize as contaminações e um grande investimento em equipamentos [4, 55]. É necessário ter também em conta que o facto de existirem células de organismos mortos na amostra, embora não signifiquem perigo potencial, significa que a amostra esteve contaminada em certo passo do seu processamento, servindo assim de alerta para possíveis contaminações na produção/processamento do alimento [2, 55].

A PCR em tempo real permite a monitorização em tempo real da formação dos produtos, pelo que não precisa da manipulação posterior do produto obtido da amplificação, o que possibilita resultados mais rápidos, em poucas horas. Esta metodologia permite a obtenção de resultados muito mais rapidamente que o PCR convencional [2, 55]. O método de PCR em tempo real é um método de fácil aplicação e usabilidade, o que o faz ser uma boa alternativa aos métodos convencionais e métodos imunoenzimáticos. Existe uma série de kits comerciais disponíveis, iQ-Check™, MicroSEQ™ e TaqMan®, que tornam a PCR em tempo real mais atractiva para os laboratórios. A maioria dos kits contém 'primers', reagentes de detecção e amplificação prontos a usar e controlos. Por outro lado, já existem no mercado equipamentos automatizados relativamente baratos e que são facilmente adaptáveis a laboratórios de rotina [55, 59].

Existem já algumas normas ISO que, para detecção e quantificação de microrganismos patogénicos alimentares, definem características de performance, requisitos gerais e definições, requisitos para preparação de amostras, requisitos para amplificação e detecção e características de performance de termocicladores.

#### 4.1.2.5. *Métodos futuros*

##### Biosensores

Os biosensores são constituídos por uma molécula de origem biológica (anticorpo, enzima, ácido nucleico, etc) ligada a um sistema físico ou físico-químico que reconhece um sinal, permitindo assim a observação de um evento biológico específico, como a interacção entre antígeno-anticorpo. Estes equipamentos como os da gama BIAcore™ têm demonstrado ser promissores em áreas como a investigação, diagnóstico clínico e análise alimentar entre outras pois permitem resultados em tempo real, embora ainda não existam métodos validados pela AFNOR [60].

Os estudos futuros inclinam-se para equipamentos portáteis que possam vir a ser de aplicação a pesquisas em campo. Apresentam também como os outros métodos a desvantagem de necessitarem de uma fase de pré-enriquecimento para detectar os microrganismos presentes em baixas contagens [4, 60].

### Microarrays

Os microarrays podem constituir uma técnica com potencial futuro na microbiologia alimentar porque permitem uma detecção rápida e simultânea de vários microrganismos patogénicos. São constituídos por muitas sondas localizadas num substrato sólido, como vidro, em que cada sonda tem como alvo uma sequência específica do microrganismo patogénico. Existe já no mercado internacional um equipamento designado VereID™ Biosystem que é constituído por um reactor de PCR em miniatura ultra-rápido associado a um microarray Verechip™. A sequência alvo é primeiro amplificada por PCR e depois, ao ser colocada no microarray, cada sequência é hibridada por uma sequência específica [4, 55, 61].

## 4.2. IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS VALIDADOS

Muitas são as questões debatidas no que diz respeito à implementação / validação de métodos num laboratório de microbiologia alimentar.

Entre elas, duas se salientam, nomeadamente:

- 1- *Quais são os passos a executar por um laboratório, quando este quer implementar um método já validado?*
- 2- *Se o laboratório quiser implementar um método alternativo ao de referência, faz sentido implementar inicialmente o método clássico (de referência)? Por outras palavras: como procede o laboratório se quiser implementar um método alternativo já validado, se não quiser recorrer à implementação do método clássico no próprio laboratório?*

Ao contrário da área da química e da área farmacêutica, na qual existem imensos documentos que estabelecem quais os passos a executar, na área da Microbiologia existem poucos documentos no qual o laboratório se possa basear para fazer a implementação dum método, o que dificulta muito os estudos, sendo que muitos laboratórios fazem estudos exaustivos enquanto outros laboratórios simplificam os mesmos. A validação dos métodos de referência está a ser actualmente alvo de discussão no âmbito do grupo ISO/TC 34/SC 9 [62].

Pretende-se responder a estas questões de modo a facilitar e contribuir para que os laboratórios de microbiologia façam uma implementação / validação eficaz e sem desperdícios de recursos e tempo.

Uma parte da resposta a estas questões é dada pela ISO16140. No artigo 5 do regulamento (EC) No 2073/2005 é referido que os métodos alternativos são aceites desde que sejam validados por comparação com o método de referência presente no anexo I do regulamento e se o método for certificado por terceiros em conformidade com a norma ISO16140 ou outros protocolos idênticos internacionalmente aceites. Os organismos de certificação existentes na Europa são a AFNOR Certification, a Microval e a Nordval. No caso dos EUA os organismos de certificação são o AOAC RI (PTM) e o AOAC International (OMA) e no Canadá o Health Canada. Estes organismos de certificação apresentam discrepâncias

quanto à validação dos métodos, mas os organismos de certificação europeus regem-se todos pela norma ISO 16140 para efectuarem as validações dos métodos alternativos.

Se um método for validado pela norma ISO 16140, os requisitos de validação (5.4.5.) da NP EN ISO 17025 estão cumpridos e o laboratório não necessita de validação extra, apenas de verificação da implementação [52].

#### **4.2.1. Obrigatoriedade de implementação/verificação**

A obrigatoriedade da implementação/verificação dos métodos normalizados vem referida na norma NP EN ISO 17025, onde é feita a seguinte referência no ponto 5.4.2. "...O laboratório deve confirmar que é capaz de utilizar devidamente métodos normalizados, antes de iniciar os ensaios ou calibrações. Se o método normalizado for modificado, a confirmação deve ser repetida..." [6]. Por outro lado, no guia do IPAC para a aplicação da norma NP EN ISO 17025 é referido no ponto 5.4.5. que o facto de se usar um método normalizado, "não dispensa a evidência de registos que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo" [63].

No Guia Eurachem sobre validação de métodos, é referido que o uso de um método, mesmo normalizado, não pode ser tomado como garantido, sem uma verificação do método pelo próprio laboratório antes do uso em rotina [64].

Neste mesmo guia, colocam-se duas questões sobre a adequabilidade de métodos já validados:

- A validação efectuada é suficiente ou haverá necessidade de uma validação adicional? A resposta indica que, para métodos normalizados como é o caso dos métodos alternativos validados pela ISO 16140, a validação efectuada é suficiente e não é necessária validação extra.
- Se a validação é suficiente, o laboratório consegue atingir o nível de performance descrito na validação? [64]

Embora os métodos estejam validados, existe uma necessidade dos laboratórios verificarem certas características destes, para conseguirem provar que o método tem o mesmo rigor nas suas instalações, com os seus equipamentos, com os seus reagentes e com a sua equipa. Por outras palavras há necessidade de provar que se consegue atingir no laboratório a performance necessária de modo a obter um desempenho do método idêntico ao que foi obtido na validação e com a obtenção de resultados fiáveis e credíveis [65].

#### **4.2.2. Como fazer a implementação dos métodos e que características devem ser estudadas?**

No guia OGC001 é referido que o grau de verificação/validação para um método normalizado deve ser menos exigente e exaustivo do que para métodos que tenham sofrido modificações da técnica ou que não estejam referidos na literatura científica e como tal

inovadores. No entanto, a norma ISO 17025 e o referido guia são muito pouco precisos em relação a que características se devem avaliar para cada tipo de implementação, inclusive no que diz respeito a métodos normalizados e à sua implementação em laboratório. Nesses dois documentos são apenas referidos os estudos de validação a realizar sem discriminar quais os parâmetros a validar consoante se trate de um método normalizado ou de um método totalmente inovador.

No caso de se pretender verificar um método validado, não é necessário fazer o estudo de todas as características do método, como no caso de uma validação. Existem características que não são alteradas de laboratório para laboratório e por isso não é necessário efectuar a sua verificação. Pelo contrário, outras características são específicas do laboratório e como tal devem ser verificadas para se assegurar que o método implementado cumpre os parâmetros da validação [65]. Como podemos determinar quais as características a estudar?

Para responder à primeira questão colocada no ponto 4.2, podemos afirmar que as características a estudar vão depender do tipo de método em análise, qualitativo ou quantitativo. Como já foi referido anteriormente, os métodos alternativos são validados pela ISO 16140 que indica quais os parâmetros a estudar consoante o tipo de método. Quando se inicia o uso de um método alternativo, é disponibilizado o relatório de validação desse método, segundo a norma ISO16140. É a partir desse relatório que o laboratório tem disponível a informação sobre as características estudadas para o método em uso e é a partir desse relatório que o laboratório pode verificar as características do método na sua realidade laboratorial. Temos que ter em conta que estamos a falar da implementação de métodos e não da sua validação, e por este motivo é dispensada a comparação entre o método a implementar e o método de referência, bastando a verificação de alguns parâmetros de validação entre o método alternativo que o laboratório vai implementar e o mesmo método alternativo já validado, o que se traduz numa diminuição de tempo e custos.

Para responder à segunda questão colocada no ponto 4.2, podemos afirmar que no caso de não existir um método clássico implementado no laboratório, o laboratório deve poder fazer a implementação do método alternativo fazendo uma implementação do método alternativo já validado. Isto só é válido se a confirmação de resultados positivos, prevista pelo método alternativo, não for realizado pelo método de referência. Segundo o IPAC, a acreditação do método de referência apenas é exigida, caso a metodologia prevista no método alternativo pressuponha, por exemplo, que a confirmação de resultados positivos seja realizada recorrendo ao método de referência.

#### **4.2.3. Implementação do método alternativo**

O objectivo da verificação de método, como foi dito, é avaliar o desempenho de um método num dado laboratório contra as especificações do método demonstradas na validação. Para além da verificação, o laboratório deve realizar os ensaios de controlo de qualidade de

acordo com a norma ISO 17025, através de controlos internos (brancos, amostras de controlos positivos e negativos) e controlos externos (ensaio interlaboratoriais).

A Tabela 2 sumariza as características relevantes de desempenho de métodos microbiológicos para a validação e para a verificação. Nesta tese não são considerados em detalhe os parâmetros de validação porque não era objectivo da mesma.

**Tabela 2.** Características de métodos para a validação e verificação de métodos (adaptado de [66]).

Características	Métodos Qualitativos		Métodos Quantitativos	
	Validação	Verificação	Validação	Verificação
Exactidão			+	+
Limite de Detecção (LOD)	+	+	+	
Limite de quantificação (LOQ)			+	
Linearidade			+	
Repetibilidade			+	+
Reprodutibilidade			+	+
Inclusividade	+		+	
Exclusividade	+		+	
Robustez	+		+	
Incerteza				+

As características de desempenho dependem da matriz alimentar. No relatório de validação esse efeito é levado em conta, visto que as características são estudadas para várias matrizes, conforme o âmbito da validação. Cabe ao laboratório determinar o seu desempenho para um tipo de matriz usada em rotina. Se utilizar os métodos em matrizes muito diferentes, que abranjam amostras de tipos diferentes de alimentos (amostras de produção primária e amostras ambientais), deve fazer a verificação para o tipo de matriz que utilizar com maior regularidade na rotina do laboratório.

#### 4.2.3.1. Métodos Qualitativos

Os métodos qualitativos alternativos validados pela AFNOR incluem métodos culturais (ex. meios cromogénicos), métodos de PCR, métodos imunoenzimáticos (ex. VIDAS®), métodos imunológicos e métodos de hibridização molecular.

De acordo com a Tabela 2, no caso de métodos qualitativos só é necessário verificar o limite de detecção.

#### Exactidão Relativa

A exactidão expressa a proximidade de um resultado ao verdadeiro valor, segundo a definição da ISO 3534-1. Por sua vez, a exactidão relativa determinada na validação é o grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo

método alternativo em amostras idênticas [67]. No caso de métodos de detecção não há necessidade de validar ou verificar este parâmetro.

#### *Especificidade Relativa /Sensibilidade Relativa /Exclusividade /Inclusividade*

A norma ISO 16140:2003 define a especificidade relativa como a capacidade do método alternativo não detectar o analito quando este não é detectado pelo método de referência, enquanto que a sensibilidade relativa é a capacidade do método alternativo detectar o analito quando este é detectado pelo método de referência. Por outro lado, os métodos validados por esta norma também são sujeitos a testes de inclusividade, detecção de um organismo alvo a partir de um grande número de estirpes e testes de exclusividade, ou seja ausência de interferência na presença de um grande número de microrganismos não alvo. Estes parâmetros são incluídos na validação de métodos qualitativos pela ISO 16140:2003 e têm em conta o efeito matriz [67].

Tendo em conta que neste documento e neste ponto estamos a referir métodos já validados e que estes parâmetros já foram estudados extensivamente não há necessidade dos laboratórios efectuarem o estudo destes parâmetros, pois estes dependem de características do método e não são alterados consoante o laboratório, desde que as matrizes analisadas sejam as mesmas da validação [65]. Para além disso, é muito difícil para os laboratórios conseguirem ter a colecção de culturas que lhes permitam fazer estes testes. No entanto haverá necessidade de evidenciar pelo relatório de validação original, ex. AFNOR, que o mesmo reflecte o estudo destes parâmetros.

#### *Limite de detecção*

Um método microbiológico qualitativo pretende verificar se um microrganismo está presente ou não na amostra em análise. Do ponto de vista de um laboratório de microbiologia é importante verificar se o método que se pretende implementar consegue detectar a presença do microrganismo, pelo que é necessário definir o nível de detecção como o número mínimo de microrganismo cultivável que pode ser detectado em 50% das ocasiões [67].

É preciso realçar que no relatório de validação este nível de detecção é determinado por comparação com o método de referência.

Os alimentos têm uma matriz heterogénea, pelo que o limite de detecção do método depende do tipo de alimento analisado. É necessário não esquecer que este estudo de implementação se refere a matrizes validadas por terceiros e presentes no relatório de validação.

O limite de detecção para métodos microbiológicos é teoricamente de 1 organismo por porção de amostra (ex. 25g). No entanto, o limite de detecção não resulta de uma relação linear de um gráfico entre a % de resultados positivos em função da concentração, devido ao efeito da distribuição de Poisson. Neste caso a curva tem um formato sigmóide, pelo que no nível de concentração de 1 organismo por amostra, apenas 63% das amostras irão testar

positivo. Ou seja, 36% das amostras serão negativas devido à falha na contaminação (spiking) devido ao efeito da distribuição de Poisson. Por outro lado, a região da curva que corresponde a 100% das amostras positivas é difícil de definir experimentalmente, devido ao formato de assíntota. Assim, é mais fácil trabalhar na zona dos 50% de concentração, onde a curva é mais próxima da linearidade. Para determinar este limite de detecção na ISO 16140 é usado o método Spearman-Kärber e o limite de detecção é expresso como a concentração que corresponde a 50% das amostras positivas  $\pm$  limites de confiança (normalmente 95%). Este valor é determinado para cada matriz [68, 69].

No relatório de validação estão disponíveis os níveis de detecção para o método alternativo e para o método de referência para cada matriz em análise.

Para fazer a verificação deste parâmetro, o laboratório deve, com base no relatório de validação, calcular o LOD<sub>50</sub> para uma matriz usada em rotina no laboratório e presente no relatório, de modo a provar que consegue alcançar o mesmo limite, usando a folha de cálculo apresentada no Anexo 7.

O laboratório deve usar 3 a 4 níveis de concentração e fazer no mínimo 3 replicados para cada nível. Quanto mais replicados se usar, maior a confiança nos resultados obtidos. É muito importante ter em conta que este método só funciona se o nível mais baixo (inoculado) apenas tiver resultados negativos, o nível mais alto só tiver resultados positivos e um dos níveis intermédios, tiver resultados parciais, isto é, positivos e negativos.

O laboratório deve preparar uma suspensão com uma quantidade de por exemplo 3 ou 5 ufc e fazer diluição para obter o valor intermédio (0,5 ou 1) e contaminar amostras de 25 g, para se fazer o estudo, como se pode ver na folha de cálculo apresentada no Anexo 7. O valor de LOD<sub>50</sub> obtido é então comparado com o valor de LOD<sub>50</sub> apresentado no relatório de validação, para a matriz em causa, sendo que o valor obtido pelo laboratório deve estar dentro do intervalo apresentado no relatório.

Para além disso, o laboratório deve realizar, utilizando os diferentes analistas, no mínimo 3 brancos por analista, controlos positivos e negativos, num mínimo de 4 por tipo e analista, mais ensaios interlaboratoriais, no mínimo de 1 participação por analista.

É de realçar que o analista que fizer o estudo acima indicado para a determinação do LOD<sub>50</sub> fica com os valores necessários para os controlos positivos e negativos. Essas mesmas amostras podem servir para serem analisadas pelos outros analistas e assim otimizar o trabalho.

#### 4.2.3.2. *Métodos Quantitativos*

Os métodos quantitativos alternativos validados pela AFNOR são todos métodos culturais (ex. meios cromogénicos) e baseados na técnica NMP (ex. TEMPO®).

Temos que analisar, entre os parâmetros de validação, aqueles que poderão necessitar de uma maior atenção na verificação da adequabilidade do método, de modo a que o resultado seja o mais credível tendo em atenção todas as variabilidades, aleatórias ou sistemáticas inerentes ao próprio laboratório. Neste caso, temos a exactidão relativa, os limites de detecção

e de quantificação, a repetibilidade e a reprodutibilidade. Quanto à especificidade, inclusividade e exclusividade, seguimos o mesmo raciocínio de quando falamos nos métodos qualitativos, pelo que não é necessário o seu estudo na implementação.

#### Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Estes parâmetros são aplicáveis a métodos instrumentais indirectos, pelo que poderiam ser verificados para métodos de PCR mas não são aplicáveis a métodos alternativos que consistem em contagem de colónias ou técnica do NMP [52].

Até este momento não há nenhum método quantitativo validado para utilização de métodos instrumentais (ex. PCR) para a microbiologia alimentar, daí que estes dois parâmetros não estejam contemplados na Tabela 2. No caso de virem a surgir, a sua verificação na implementação de um método pode ser feita através da preparação de amostras independentes, nos valores de LOD e LOQ mencionados no relatório de validação e verificar se os valores obtidos estão dentro de um critério de aceitação (ex. 90% de resultados positivos). A norma francesa NF T90-471, embora seja para análise de *Legionella* em águas, dá indicações muito úteis sobre a forma de proceder [70].

#### Exactidão/Veracidade ('bias')

A exactidão expressa a proximidade de um resultado ao verdadeiro valor, segundo a definição da ISO 3534-1. A exactidão relativa como referida na norma ISO 16140 é complementar à definição de veracidade, grau de concordância entre o valor médio de um conjunto de ensaios e o valor aceite como referência, presente na ISO 3534-1. A veracidade é expressa através do 'bias', que é a tendência da medição [64].

Para se estimar a exactidão é necessário conhecer qual o valor verdadeiro ou conhecido de uma amostra mas em microbiologia é difícil saber qual o valor verdadeiro de uma análise, devido à natureza empírica das contagens. Segundo a norma ISO 7218, os ensaios interlaboratoriais são uma ferramenta útil para a avaliação do 'bias' do laboratório. A norma ISO 19036 também reconhece a dificuldade de estimar este parâmetro em microbiologia, e recomenda a utilização de ensaios interlaboratoriais e do Material de Referência Certificado para a sua estimativa [62, 71].

Assim para verificar a exactidão podem ser usados:

- **Ensaio interlaboratoriais**, através da análise do z-score
- **Material de Referência Certificado**, em que se conhece a concentração do microrganismo e comparar o valor obtido com o valor conhecido
- **Ensaio de recuperação**, em que se procede à contaminação das amostras com material de referência. Segundo o guia ICH, a exactidão deve ser determinada para toda a gama do procedimento analítico. Segundo este guia, devem ser efectuados pelo menos 3 níveis de concentrações preparadas de forma independente e feitas 3 determinações em cada nível, incluindo o LOQ

[72]. Os ensaios de recuperação são opcionais, para o caso de não se optar pelas primeiras duas opções.

### Precisão (Repetibilidade e Reprodutibilidade)

A precisão está associada aos erros aleatórios e segundo a ISO 3534-2 é definida como a proximidade entre resultados independentes obtidos em condições estipuladas, de repetibilidade e precisão intermédia. É importante perceber o que significa cada condição, para se perceber o que se deve estudar na prática do laboratório e depois saber porquê e onde se podem aplicar esses diferentes tipos de precisão.

A repetibilidade é a proximidade de resultados sucessivos e independentes obtidos por um método, ao ser efectuado por um analista, numa amostra, usando o mesmo equipamento, lote de cultura e diluente e testado em pouco tempo, num laboratório (pelo menos  $n=10$ ) [67, 73].

É uma medida da variabilidade e é expressa em termos de desvio padrão da repetibilidade ( $s_r$ ). Também é possível estimar o limite de repetibilidade ( $r$ )<sup>2</sup>, como o valor limite que é permitido, com uma probabilidade de 95%, estar a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade. Se a diferença entre dois resultados exceder esse limite, os resultados devem ser considerados suspeitos [64, 67].

A reprodutibilidade é a proximidade de resultados obtidos por um método, ao ser efectuado por diferentes analistas, em diferentes amostras, usando diferentes equipamentos, diferentes lotes de cultura e diluentes, durante um intervalo de tempo alargado, em diferentes laboratórios [67, 73]. A reprodutibilidade é expressa em termos de desvio padrão da reprodutibilidade ( $s_R$ ). Também é possível calcular o limite de reprodutibilidade ( $R$ )<sup>3</sup>, para estimar se a diferença entre dois resultados é significativa [64, 67].

A repetibilidade corresponde ao valor mais baixo de precisão, enquanto que a reprodutibilidade corresponde ao mais alto.

Entre estes valores extremos de precisão, existe a precisão intermédia ou reprodutibilidade intra-laboratorial, que expressa as variações dentro do laboratório, ou seja, qual a variação que existe com a utilização de diferentes equipamentos, analistas, meios de cultura, diluentes na análise de uma amostra [64, 65]. A precisão intermédia em microbiologia é muito importante no cálculo de incertezas. A precisão intermédia assemelha-se à definição de reprodutibilidade, no entanto corresponde a resultados obtidos num só laboratório. Por exemplo, dois operadores A e B executam o mesmo procedimento (Contagem de Microrganismos Totais), na mesma amostra, analisadas num período de dias mais alargado e usando diferentes equipamentos.

Os relatórios de validação de acordo com a ISO 16140 dividem-se em duas partes, estudo de comparação dos métodos feito por um laboratório e depois o estudo interlaboratorial

---

<sup>2</sup> Limite de repetibilidade  $r = 2,8 s_r$

<sup>3</sup> Limite de reprodutibilidade  $R = 2,8 s_R$

que envolve vários laboratórios. Na primeira parte do estudo, é feita a determinação da repetibilidade para o método alternativo e para o método de referência, para as várias matrizes estudadas. Na segunda parte do estudo, vários laboratórios determinam a repetibilidade e reprodutibilidade para uma única matriz e para vários níveis de contaminação [67].

### **Repetibilidade**

O laboratório deve verificar a repetibilidade numa matriz, em que um analista analisa a amostra 6 vezes de seguida e calcula a repetibilidade de acordo com a fórmula abaixo indicada. O ensaio de repetibilidade deve ser feito a partir da amostra inicial e seguir todo o protocolo. Cada resultado é obtido da mesma forma usada para apresentar resultados finais, a partir de duas diluições sucessivas e utilizando as fórmulas indicadas na norma do método ou na ISO 7218. Os valores obtidos pelo técnico são utilizados para calcular o desvio padrão da repetibilidade de acordo com a fórmula 1 e utilizando uma folha de cálculo do tipo da indicada na Tabela 3. O valor obtido (no exemplo dado na tabela 3,  $s_r = 0,229$ ) deve ser comparado com o valor dado no relatório de validação.

$$(1) \quad s_r = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

**Tabela 3.** Exemplo de cálculo de repetibilidade.

i	$y_i$	$x_i = \log_{10}(y_i)$	$\bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$s_r$
1	6,7E+04	4,83	4,86	1,03E-03	0,229
2	7,1E+04	4,85		4,82E-05	
3	1,2E+05	5,08		4,88E-02	
4	1,0E+05	5,00		2,01E-02	
5	1,9E+04	4,28		3,36E-01	
6	1,3E+05	5,11		6,54E-02	

O laboratório pode repetir o ensaio da repetibilidade para cada um dos técnicos e para outras matrizes que não tenham entrado no relatório de validação.

### **Reprodutibilidade e incerteza**

Para a determinação da reprodutibilidade intra-laboratório ou precisão intermédia, proceder como no cálculo das incertezas, segundo o OGC005. Segundo o ponto 5.4.6. da norma ISO 17025, os laboratórios devem estimar a incerteza dos ensaios. A incerteza é o parâmetro, associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. O cálculo de incertezas, para métodos quantitativos em microbiologia, pode ser feito através da abordagem geral, e baseia-se na

variabilidade total do processo analítico, que inclui a componente sistemática ('bias') e a componente aleatória (precisão).

Esta abordagem baseia-se na estimativa experimental do desvio padrão da reprodutibilidade do resultado final de medição, que pode ser calculado através de dados do controlo de qualidade interno (duplicados) para cada método quantitativo e para cada matriz [43, 44].

No caso da implementação de um método para verificação da reprodutibilidade, os dados usados para cálculo da incerteza podem ser aproveitados para verificar a reprodutibilidade do método. Assim, cada par de técnicos realiza ensaios a partir da mesma amostra (a partir da pesagem inicial ou não havendo amostras contaminadas naturalmente, a partir da mesma amostra já homogeneizada, que seja contaminada artificialmente), num total de 6 ensaios diferentes, realizados por diferentes pessoas, em 2 dias com a mesma amostra, se esta for estável. Para cada par de resultados, a diferença absoluta tem que ser inferior ao limite de reprodutibilidade, dado no relatório de validação, para verificar se a diferença entre os resultados obtidos por dois analistas é significativa. O valor do limite de reprodutibilidade pode ser dado directamente ou usando a fórmula ( $R = 2,8 s_R$ ). O valor do limite de reprodutibilidade presente no relatório, conforme já foi dito acima, representa o máximo de precisão possível, pelo que é expectável que o valor obtido pelo laboratório seja inferior.

O desvio padrão da reprodutibilidade é também usado para cálculo da incerteza, valor que deve ser incluído no relatório de implementação de um método, mas tendo no mínimo 10 resultados de amostras realizadas em condições de reprodutibilidade.

É muito importante perceber que embora a incerteza tenha de ser calculada quando se implementa o método, o valor da incerteza deve ser actualizado anualmente com os dados obtidos.

#### **4.2.4. Qualificação do Analista**

A qualificação do analista é um ponto muito importante na implementação do método e não pode ser descurada. É importante que o analista esteja perfeitamente integrado e familiarizado com o método antes de o executar em rotina. A formação é um dos aspectos fundamentais na qualificação e pode incluir os fundamentos teóricos e a componente prática do método [64, 65].

Na verificação de um método qualitativo, se cada analista efectuar brancos, controlo positivo, negativo e ensaios interlaboratoriais fica automaticamente qualificado para realizar o ensaio. Para métodos quantitativos, o analista fica qualificado se participar nos ensaios de repetibilidade, reprodutibilidade, ensaios interlaboratoriais e efectuar brancos, controlo positivo e negativo.

Depois da qualificação inicial do analista, o laboratório deve evidenciar que o analista continua apto para executar a técnica, pelo que, tal como previsto no ponto 5.2. da norma ISO 17025, tem que se juntar ao processo de verificação do método, a avaliação de desempenho dos analistas que executam a técnica [6].

A qualificação do analista pode ser efectuada através de:

- Participação em ensaios interlaboratoriais (avaliação do Z-score)
- Uso de amostras cegas
- Critério de precisão intermédio dos duplicados [64, 65]

#### Critério de precisão

Para a construção das cartas de duplicados, usadas para controlo de qualidade interno, devem ser recolhidos pelo menos 15 resultados iniciais, em condições de precisão intermédia, ou seja em dias diferentes, efectuados por todos os analistas e equipamentos. As cartas de duplicados são construídas para cada método (Ex. *E.coli*) e servem para cálculo do critério de precisão. Este critério é reavaliado ao longo dos anos e serve também para avaliar o desempenho dos técnicos.

Para calcular o critério de precisão, deve-se converter cada par de duplicados (feitos por diferentes analistas) em  $\text{Log}_{10}$ . A diferença entre dois logaritmos deve ser inferior a 0.5 log [74]. Determina-se o valor da amplitude ( $R_{\log}$ ) dos logaritmos  $|\text{LogD1}-\text{LogD2}|$  e depois a média dessas amplitudes em que  $\bar{R} = \Sigma (R_{\log}/n)$ . O critério de precisão é calculado pela fórmula  $\bar{R} \times 3,27$ . Esse valor de critério de precisão é usado como linha superior para verificar a variabilidade dos duplicados realizados em rotina durante o ano pelos diferentes analistas.

É possível conjugar experimentalmente os dados da incerteza com os dados do critério de precisão. Assim, quando se está a fazer duplicados de uma amostra para calcular a incerteza, se cada analista analisar a diluição  $10^{-1}$  do outro analista em duplicado, pode usar esse dado para o critério de precisão.

## 5. CONCLUSÃO

O objectivo desta tese era focar três pontos essenciais para os laboratórios de microbiologia alimentar: (i) a segurança alimentar; (ii) os microrganismos patogénicos e patogénicos emergentes e (iii) as preocupações com os métodos usados nos laboratórios para análise dos alimentos.

Comparámos os valores guia para alimentos prontos-a-comer do guia do INSA com guias internacionais, como Reino Unido, Hong Kong e Nova Zelândia, para verificar se as preocupações e as tendências são diferentes nos vários países. De uma forma geral, embora para muitos microrganismos os intervalos de critérios sejam semelhantes, existem diferenças entre os guias. As principais diferenças são o modo como cada país divide as categorias alimentares para análise de microrganismos totais e a escolha dos microrganismos indicadores e patogénicos para análise. O guia português é o mais antigo de todos os guias analisados, o que pode justificar a ausência de alguns microrganismos patogénicos como *E. coli* O157 e a presença de coliformes como indicador, em vez da análise de Enterobacteriaceae, presentes nos outros guias. Recomenda-se que conforme os objectivos dos operadores alimentares e

dos laboratórios, sejam analisados os guias aqui referidos, para obter informações sobre critérios microbiológicos para microrganismos indicadores e patogénicos que não estão presentes no guia português.

Os microrganismos patogénicos alimentares que causam doenças de origem alimentar não permanecem imutáveis no tempo, ou seja, existem vários factores que levam a uma variação na prevalência destes microrganismos. Os factores podem ser derivados da capacidade laboratorial de os detectarmos, das medidas de prevenção e controlo de factores de emergência. Apesar das medidas de prevenção e controlo para bactérias como *Salmonella* e *Campylobacter*, a prevalência destas continua. Para além disso, microrganismos patogénicos como os vírus e os parasitas têm ganho importância nas últimas décadas, justificado pela melhoria nas técnicas de biologia molecular. Embora seja difícil prever que microrganismos possam emergir no panorama das doenças alimentares, pretende-se chamar a atenção dos laboratórios para a possível emergência de outros microrganismos que não estão presentes em regulamentos ou em valores guias. Algumas normas ISO já publicadas, e outras em publicação, revelam já uma preocupação com a emergência de microrganismos patogénicos e podem ser uma indicação/apoio para laboratórios que queiram implementar outras técnicas.

Os métodos alternativos têm ganho importância nos laboratórios de microbiologia e têm vantagens relativamente aos métodos clássicos, como a automatização, a menor carga de trabalho e a rapidez na obtenção de resultados.

De modo a que os laboratórios possam cumprir com os requisitos da norma 17025, para usarem métodos alternativos validados por terceiros têm que verificar/implementar os métodos no seu laboratório. Não existem muitos documentos que possam ajudar os laboratórios, pelo que se apresenta um protocolo para implementação dos métodos alternativos pelos laboratórios. Para métodos qualitativos os laboratórios devem verificar o LOD<sub>50</sub> e para métodos quantitativos devem verificar a exactidão, a repetibilidade e precisão intermédia e a incerteza.

Pretendeu-se sistematizar a implementação de métodos alternativos numa óptica de aproximação de métodos culturais/métodos instrumentais. No futuro, os laboratórios têm que considerar o tipo de métodos e a aplicabilidade destas propostas e perceberem que cada vez mais os conceitos de microbiologia em termos de validação/implementação de métodos se vão aproximando mais dos da química, uma vez que o que é previsível é que os ensaios sejam baseados em métodos instrumentais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EC, *Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios*. 2002, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. p. 1-24.
2. Cocolin, L., et al., *The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms*. Trends in Food Science & Technology, 2011. **22**, **Supplement 1**(0): p. S30-S38.
3. Santos, M., et al., *Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração*. Revista Ordem Dos Farmacêuticos, 2005. **64**: p. 66-68.
4. Mandal, P.K., et al., *Methods for rapid detection of foodborne pathogens:an overview*. American Journal of Food Technology, 2011. **6**(2): p. 87-102.
5. *AFNOR certification, Methods taken as a reference for each micro-organism detected. Última actualização em 04-07-2012. [Consultado em 24-08-2012] Disponível em <http://www.afnor-validation.com/afnor-validation-validated-methods/validated-methods.html>*.
6. ISO17025, *NP EN ISO/IEC 17025 Requisitos gerais de competência para laboratório de ensaio e calibração*. 2005.
7. Leon G.M, G., *Food safety objective: An integral part of food chain management*. Food Control, 2005. **16**(9): p. 801-809.
8. Roberts, D.G., M., *Practical Food Microbiology*. 3ª ed. 2003, UK: Blackwell Publishing.
9. Stringer, M., *Summary report: Food safety objectives - role in microbiological food safety management*. Food Control, 2005. **16**(9): p. 775-794.
10. CAC, *Report No CAC/GL 63-2007 - Principles and Guidelines for the conduct of microbiological risk management (MRM)*. Codex Alimentarius Guidelines, 2007.
11. EC, *Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos.COM (1999) 719 final*. 2000.
12. EC, *Regulamento (CE) No 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 April 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios*. 2004, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. p. 1-23.
13. EC, *Discussion paper on strategy for setting microbiological criteria for foodstuffs in Community legislation*. 2005. p. 1-34.
14. EC, *Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal*. 2004, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. p. 55-205.
15. EC, *Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano*. 2004, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. p. 206-320.
16. EC, *Regulamento (CE) n.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais* 2004, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. p. 1-141.
17. Decreto-Lei, n.º 113/2006. D.R. n.º 113, Série I-A de 2006-06-12.
18. CAC, *Report No CAC/GL 21-1997 - Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods*. Codex Alimentarius Guidelines, 1997.
19. van Schothorst, M., et al., *Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives*. Food Control, 2009. **20**(11): p. 967-979.
20. HPA, *Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market*. Disponível em [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1259151921557](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557). 2009.
21. Whiting, R.C., et al., *Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **110**(3): p. 263-267.

22. NSWFA, *Microbiological quality guide for ready-to-eat foods. A guide to interpreting microbiological results*. 2009.
23. Stannard, C., *Development and use of microbiological criteria for foods*. Food Science & Technology Today, 1997. **11**(3): p. 137-177.
24. EC, *Regulamento (CE) No 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*. 2005, Jornal Oficial da União Europeia. p. 1-26.
25. EC, *Regulamento (CE) N. o 365/2010 da Comissão de 28 de Abril de 2010 que altera o Regulamento (CE) n. o 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a Enterobacteriaceae no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a Listeria monocytogenes no sal alimentar*. 2010, Jornal Oficial da União Europeia. p. 9-11.
26. EC, *Regulamento (CE) No 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n.o 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*. 2007, Jornal Oficial da União Europeia. p. 12-29.
27. EC, *Regulamento (UE) N. o 1086/2011 da Comissão de 27 de Outubro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) n. o 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo I do Regulamento (CE) n. o 2073/2005 da Comissão no que diz respeito a Salmonella em carne fresca de aves de capoeira*. 2011, Jornal Oficial da União Europeia. p. 7-11.
28. HPFB, *Standards and Guidelines for microbiological safety of food - An interpretative summary*. Health Products and Food Branch (HPFB) 2008.
29. RD3484, *BOE nº 11 - Real Decreto 3484/2000 de 29 Dezembro, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas*. 2000.
30. RDC, *Resolução - RDC nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, ANVISA*. 12/2001.
31. RM591, *Resolución Ministerial nº 591-2008/MINSA - Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. 2008.
32. RTCA, *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 - Alimentos. Criterios Microbiológicos para la inocuidad de alimentos*. 2009.
33. CFS, *Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food*. The Centre for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department Hong Kong, 2007.
34. PHLS, *Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale*. Communicable Disease & Public Health, 2000. **3**(3): p. 163-167.
35. WHO, *Fact sheet N°237 - Food safety and foodborne illness*. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. 2007.
36. Adams, M. and Y. Motarjemi, *Basic Food Safety for Health Workers - Capítulo 1*. Disponível em <http://www.who.int/foodsafety/publications/capacity/en/1.pdf>. WHO World Health Organization, 1999.
37. Viegas, S.J., *Alterações do estado de saúde associadas à alimentação - Contaminação microbiológica dos alimentos*. INSA - Departamento de Alimentação e Nutrição, 2009.
38. Tauxe, R.V., *Emerging foodborne pathogens*. International journal of food microbiology, 2002(1-2): p. 11.
39. Ecker, D.J., et al., *The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents*. BMC Microbiol, 2005. **5**: p. 19.
40. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(5): p. 607-25.
41. Slifko, T.R., H.V. Smith, and J.B. Rose, *Emerging parasite zoonoses associated with water and food*. International Journal for Parasitology, 2000. **30**(12–13): p. 1379-1393.
42. Busani, L., et al., *Laboratory surveillance for prevention and control of foodborne zoonoses*. Ann Ist Super Sanità, 2006. **42**(4): p. 401-4.
43. Newell, D.G., et al., *Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **139**, Supplement(0): p. S3-S15.
44. Broglia, A. and C. Kapel, *Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses*. Veterinary Parasitology, 2011. **182**(1): p. 2-13.

45. EFSA, *Definition and description of "Emerging risks" within the EFSA's mandate*, SCIENTIFIC COMMITTEE & ADVISORY FORUM UNIT. 2007.
46. Thompson, R.C.A., *The future impact of societal and cultural factors on parasitic disease – some emerging issues*. International Journal for Parasitology, 2001. **31**(9): p. 949-959.
47. Marques, A., et al., *Climate change and seafood safety: Human health implications*. Food Research International, 2010. **43**(7): p. 1766-1779.
48. Albrecht, J.A. and D. Nagy-Nero, *Position of the American Dietetic Association: Food and water safety*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(8): p. 1449-60.
49. Nyachuba, D.G., *Foodborne illness: is it on the rise?* Nutrition Reviews, 2010. **68**(5): p. 257-269.
50. White, D.G., et al., *Antimicrobial resistance of foodborne pathogens*. Microbes and Infection, 2002. **4**(4): p. 405-412.
51. ISO, *TC 34/SC 9 - Standards under development*. [Consultado em 26/08/2012]. Disponível em [www.iso.org](http://www.iso.org).
52. Lombard, B., *ISO Standardization and Validation of Reference Testing Methods — Validation of Alternative Methods in Food Microbiology—*. Japanese Journal of Food Microbiology, 2010. **27**(1): p. 8-20.
53. Rapidmicrobiology.com. *Automating the Food Microbiology Laboratory*. [Consultado em 16/05/2012]. Disponível em <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/Automation-food.php>
54. Tavakoli, H., et al., *The Application of Chromogenic Culture Media for Rapid Detection of Food and Water Borne Pathogen*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 2008. **4**(6): p. 693-698.
55. Janzten, M.M., et al., *Review . Specific detection of Listeria monocytogenes in foods using commercial methods : from chromogenic media to real-time PCR*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2006. **4**(3): p. 235-247.
56. Biomérieux, *Brochura Vidas®.02-10/006GB99080C*. [Consultado em 06/08/2012].
57. Biomérieux, *Brochura TEMPO®. 10-10/ 006PT99187A*. [Consultado em 06/08/2012].
58. Videira, A., *Engenharia Genética Princípios e Aplicações*, ed. L.-E. Técnicas. 2001, Lisboa.
59. Postollec, F., et al., *Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology*. Food Microbiology, 2011. **28**(5): p. 848-861.
60. Leonard, P., et al., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(1): p. 3-13.
61. Vereduslaboratories, *Brochura VerelD™ Biosystem*. [Consultado em 06-08-2012]. Disponível em <http://www.vereduslabs.com/products.html>.
62. ISO7218, *ISO 7218 "Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*. 2007.
63. OGC001, *OGC001 "Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025"*. 2010. p. 1-21.
64. Eurachem, *The Fitness for purpose of Analytical Methods - A laboratory guide to method validation and related topics*. 1998.
65. AOAC, *How to meet ISO 17025 Requirements for Method Verification*. 2008.
66. WG3, *Comunicação pessoal Bertrand Lombard - ISO/TC 34/SC 9/WG 3 N. 130 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for validation of microbiological methods - Part 4: Protocol for the verification of microbiological methods (Preliminary work item (PWI))*. 2012.
67. ISO16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods* 2003.
68. AOAC, I., *Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology (US FDA Contract #223-01-2464, Modification #12) Appendix K: Proposed Use of a 50% Limit of Detection Value in Defining Uncertainty Limits in the Validation of Presence-Absence Microbial Detection Methods*. 2006.
69. AOAC, I., *Presidential Task Force on Best Practices for Microbiological Methodology (US FDA Contract #223-01-2464, Modification #12) Appendix A: DLWG Executive Summary*. 2006.
70. NFT90-471, *NF T90-471 Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR)*. 2010.

71. ISO19036, ISO/TS 19036 "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations". 2006.
72. ICH, *Guideline, Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*,. 2005.
73. VIM3, *Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos Básicos e Gerais e Termos Associados (2007)*. 2007.
74. ISO4129, *Regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas*. 1994.
75. Lund, B.M. and S.J. O'Brien, *Microbiological safety of food in hospitals and other healthcare settings*. *J Hosp Infect*, 2009. **73**(2): p. 109-20.
76. FDA, *Bad Bug Book 2nd Edition - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Atualizado em 04/03/2012. [Consultado em 13/08/2012]. Disponível em [www.fda.gov](http://www.fda.gov)*. 2012.
77. Carter, A., *Personnal communication "Using the Spearman-Karber method to estimate the ED50"*. Wyeth-Ayerst Research, Chazy, NY, 1994.
78. Hitchins, A., *Appendix L - STWG Part 4b - LOD 50% Spearman -Karber.xls - "Limit of Detection Program for Qualitative Microbiology Methods"*. 2002.
79. Biernat Jadwiga, et al., *Monography "New trends in food analytics"*, UWP, Editor. 2011: Wroclaw.

ANEXO 1. VALORES GUIA PARA MICRORGANISMOS INDICADORES (adaptado de [3, 20, 22, 33]).

	Países/ Instituições	Grupo de Alimentos <sup>a</sup>	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
			Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
<b>E. coli (Total)</b>	Portugal / INSA (2005)	1 e 2	<10	NA	≥ 10	NA
		3	≤ 10	> 10 <10 <sup>2</sup>	≥ 10 <sup>2</sup>	NA
	UK / HPA (2009)	-	<20	20 - ≤ 10 <sup>2</sup>	> 10 <sup>2</sup>	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	<3	3 - <10 <sup>2</sup>	≥ 10 <sup>2</sup>	NA
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	<20	20 - <100	≥ 100	NA
<b>Enterobacteriaceae</b>	Portugal / INSA (2005)					
	UK / HPA (2009)	-	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - ≤ 10 <sup>4</sup>	> 10 <sup>4</sup>	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	<10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - <10 <sup>4</sup>	≥ 10 <sup>4</sup>	NA
Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)						
<b>Listeria spp.</b>	Portugal / INSA (2005)	1, 2 e 3	<10 <sup>2</sup>	NA	≥ 10 <sup>2</sup>	NA
	UK / HPA (2009)	-	<10 <sup>b</sup>	10 - ≤ 10 <sup>2c</sup>	> 10 <sup>2</sup>	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)					
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)					
<b>Coliformes Totais</b>	Portugal / INSA (2005)	1	≤ 10	>10 - ≤ 10 <sup>2</sup>	> 10 <sup>2</sup>	NA
		2	≤ 10	>10 - ≤ 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>3</sup>	NA
		3	≤ 10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup> - ≤ 10 <sup>4</sup>	> 10 <sup>4</sup>	NA
<b>Bolores</b>	Portugal / INSA (2005)	1 <sup>d</sup> e 2	≤ 10	>10 - ≤ 10 <sup>2</sup>	> 10 <sup>2</sup>	Equacionado caso a caso
		3	≤ 10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup> - ≤ 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>3</sup>	Equacionado caso a caso
<b>Leveduras</b>	Portugal / INSA (2005)	1 <sup>d</sup> e 2	≤ 10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup> - ≤ 10 <sup>4</sup>	> 10 <sup>4</sup>	NA
		3	≤ 10 <sup>2</sup>	>10 <sup>2</sup> - ≤ 10 <sup>5</sup>	> 10 <sup>5</sup>	NA

**a** - Ver anexo nº 3 para a classificação dos grupos de alimentos (1,2 e 3) para Portugal

**b** - Não detectado em 25 g por enriquecimento de alimentos de alto risco capazes de suportar o crescimento de *Listeria* spp.

**c** - Detectado em 25 g por enriquecimento de alimentos de alto risco capazes de suportar o crescimento de *Listeria* spp.

**d**- Aplicável em produtos conservados no frigorífico

**NA** – Não aplicável

ANEXO 2. VALORES GUIA PARA MICRORGANISMOS PATOGENICOS (adaptado de [3, 20, 22, 33]).

	Países/ Instituições	Grupo de Alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
			Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
<b>Campylobacter spp.</b>	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
	UK / HPA (2009)	-	Ausente em 25 g	-	- Presente em 25 g	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
<b>E.coli O157 e outros VTEC</b>	Portugal / INSA (2005)					
	UK / HPA (2009)	-	Ausente em 25 g	-	- Presente em 25 g	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)					
	Hong-Kong / Centre for Food Safety <sup>a</sup> (2007)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
<b>Salmonella spp.</b>	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
	UK / HPA (2009)	-	Ausente em 25 g	-	- Presente em 25 g	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
<b>Vibrio cholerae</b>	Portugal / INSA (2005)					
	UK / HPA (2009) <sup>b</sup>	-	Ausente em 25 g	-	- Presente em 25 g	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)					
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
<b>Vibrio parahaemolyticus</b>	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	Ausente em 25 g	-	-	Presente em 25 g
	UK / HPA (2009)	-	<20	20 - ≤10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>3</sup>	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	Ausente em 25g	Se detectado proceder como indicado em baixo		
			<3	3- <10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - <10 <sup>4</sup>	≥ 10 <sup>4</sup>
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	<20	20- <100	100 - <10 <sup>3</sup>	≥ 10 <sup>3</sup>

**a** - apenas faz referência a *E. coli* O157

**b**- *Vibrio cholerae* – grupo O1 e O139

	Países/ Instituições	Grupo de Alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
			Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
<i>Clostridium perfringens</i>	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	<10	$\geq 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
	UK / HPA (2009)	-	<10	$10 - \leq 10^4$	$> 10^4$	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	$< 10^2$	$10^2 - < 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$\geq 10^4$
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	<20	20- <100	100 - <10 <sup>4</sup>	$\geq 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i> e outros estafilococos coagulase positivos	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
	UK / HPA (2009)	-	<20	$20 - \leq 10^4$	$> 10^4$	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	$< 10^2$	$10^2 - < 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$\geq 10^4$
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	<20	20- <100	100 - <10 <sup>4</sup>	$\geq 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	Portugal / INSA (2005)	1,2 e 3	$\geq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
	UK / HPA (2009) <sup>a</sup>	-	$< 10^3$	$10^3 - \leq 10^5$	$> 10^5$	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	-	$< 10^2$	$10^2 - < 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$\geq 10^4$
	Hong-Kong / Centre for Food Safety (2007)	-	$< 10^3$	$10^3 - < 10^4$	$10^4 - < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Listeria monocytogenes</i>	Portugal/INSA (2005)	1,2 e 3	Ausente em 25 g	Presente em 25 g ( $< 10^2$ ) <sup>b</sup>	-	$\geq 10^2$
	UK/ HPA (2009)	-	$< 10$ <sup>c</sup>	$10 - \leq 10^2$ <sup>d</sup>	$> 10^2$	-
	Nova Zelândia NSW Food Authority (2009)	1	Ausente em 25 g			Detectado em 25 g
		2	Ausente em 25 g	Detectado mas $< 10^2$		$\geq 10^2$
		3	Ausente em 25 g	Detectado mas $< 10^2$		$\geq 10^2$
	Hong-Kong Centre for Food Safety (2007)	Para alimentos refrigerados (excluir comida congelada) ou alimentos para lactentes	Ausente em 25 g	NA	NA	Detectado em 25 g
Para outro tipo de alimentos prontos a comer		<20	20 - <100	NA	$\geq 100$	

a - *Bacillus cereus* e outros *Bacillus* spp. patogénicos

b - equacionado caso a caso

c - Não detectado em 25 g por enriquecimento de alimentos de alto risco capazes de suportar o crescimento de *Listeria monocytogenes*

d - Detectado em 25 g por enriquecimento de alimentos de alto risco capazes de suportar o crescimento de *Listeria monocytogenes*

NA- Não aplicável

ANEXO 3. VALORES GUIA PARA MICRORGANISMOS TOTAIS – GUIAS DE PORTUGAL, NOVA ZELÂNDIA E HONG KONG (adaptado de [3, 22, 33]).

		Categoria	Exemplos	Resultados Microbiológicos (ufc/g quando não indicado)			
				Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável/ Potencialmente perigoso
Portugal/ INSA	1	Refeições/Sandes/Bolos/Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada	Feijoada, Pizza, Bacalhau à Brás com salsa previamente processada, Salada de batata com maionese industrial, Pastéis de bacalhau/Croquetes/ Rissóis, Sandes de carne assada, Sandes de pátê de atum (maionese industrial), Omeleta de Queijo /fiambre, Mousse de chocolate instantânea, Bolo de chocolate, Arroz doce com ou sem canela, Gelatinas, Salada de fruta/fruta laminada em calda	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	Refeições/Sandes/Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface, Salada de feijão-frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete, Prato de peixe/carne/ovos adicionado de salada de vegetais, ou frutos, Bacalhau à Brás c/ salsa crua e/ou azeitonas (...)	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	Saladas/ Vegetais/Frutos crus	Alface, tomate, cenoura, couve roxa, salada de frutas/fruta natural laminada, morangos	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Nova Zelândia / NSW Food Authority	A	Aplica-se a alimentos pronto-a-comer em que todos os componentes estão completamente cozinhados para venda ou consumo imediato	Tarte de carne	$<10^4$	$<10^5$	$\geq 10^5$	NA
	B	Aplica-se a alimentos pronto-a-comer completamente cozinhados mas que são sujeitos a manuseamento ou processamento antes do consumo	Pastelaria com creme de ovos	$<10^6$	$<10^7$	$\geq 10^7$	NA
	C	Alimentos que contêm ingredientes fermentados não cozinhados ou fruta e vegetais frescos	Fruta e mistura de iogurte	N/A	N/A	N/A	NA
Hong Kong/ Centre for Food Safety	1	As categorias alimentares estão organizadas por tipos de alimentos. (Ver anexo nº5)		$<10^3$	$10^3 < 10^4$	$> 10^4$	NA
	2			$<10^4$	$10^4 < 10^5$	$> 10^5$	NA
	3			$<10^5$	$10^5 < 10^6$	$> 10^6$	NA
	4			$<10^6$	$10^6 < 10^7$	$> 10^7$	NA
	5			NA	NA	NA	NA

NA – Não aplicável

ANEXO 4. – VALORES GUIA PARA MICROORGANISMOS TOTAIS- GUIA HPA UK (adaptado de [20]).

Categoria		Exemplos	Resultados Microbiológicos (ufc/g quando não indicado)		
			Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório
1	Alimentos em sacos, cartões, engarrafados, e em latas imediatamente após remoção do contentor	Produtos em latas como atum, salmão, conservas de carne, sopas, guisados, sobremesas fruta; produtos UHT	<10	NA	<sup>a</sup>
2	Alimentos cozinhados imediatamente antes da venda ou consumo	Takeaway, hambúrgueres, kebabs, salsichas, pizza e refeições prontas (cozinhadas/refrigeradas & cozinhadas/congeladas) após regeneração	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - <10 <sup>5</sup>	≥10 <sup>5</sup>
3	Alimentos cozinhados refrigerados mas com um mínimo de manuseamento antes da venda ou consumo; alimentos pasteurizados em lata que requerem refrigeração	Tartes inteiras, rolos de salsichas, chamuças, flans, quiches, porções de galinha, presunto enlatado, alimentos pasteurizados incluindo sumo de fruto e sopas, sobremesas	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - <10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>
4	Pastelaria e produtos de confeitaria sem creme de pastelaria, alimentos em pó	Bolos sem creme de pastelaria, sopa em pó, leite em pó, produtos lácteos em pó, outros alimentos em pó prontos a comer após reconstituição ou aquecimento	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - <10 <sup>6</sup>	≥10 <sup>6</sup>
5	Alimentos cozinhados refrigerados mas com algum manuseamento antes da venda ou do consumo	Carnes fatiadas, tartes fatiadas, paté, sanduíches sem saladas, peixe fumado quente, moluscos, crustáceos e outros mariscos fora da concha/casca	<10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> - <10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup> <sup>b</sup>
6	Produtos lácteos não fermentados e sobremesas à base de leite, mayonnaise e molhos baseados em mayonnaise, molhos cozinhados	A maioria do leite e manteiga, cremes, gelados, queijo fresco, bolos com cremes de pastelaria	<10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> - <10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>
7	Alimentos misturados com molhos, pastas	coleslaw, dips, taramasalata, houmous	<10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> - <10 <sup>7</sup>	≥10 <sup>7</sup>
8	Produtos alimentares com prazos de validade alargados que requerem refrigeração	Produtos embalados em MAP ou vácuo: carne, peixe, fruta e vegetais	<10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> - <10 <sup>8</sup>	≥ 10 <sup>8</sup> <sup>b</sup>
9	Carne e peixe pronto a comer cru, peixe fumado frio	Sushi, salmão fumado	<10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> - <10 <sup>7</sup>	<sup>c</sup>
10	Produtos alimentares conservados - salmoura, marinados ou salgados	Peixe em salmoura ou salgado, marisco cozinhado em vinagre, vegetais em vinagre ou óleo, ervas, especiarias	NA	NA	<sup>c</sup>
11	Alimentos secos	Frutos, bagas, passas, nozes, sementes de girassol, ervas, especiarias, peixe seco	NA	NA	<sup>c</sup>
12	Fruta e vegetais frescos, produtos contendo vegetais crus	Fruta, saladas de fruta pré-preparadas, saladas, sanduíches com saladas, saladas mistas contendo vegetais crus	NA	NA	<sup>c</sup>
13	Carne fermentada, curada e seca, vegetais fermentados, queijo curado	Salame/salsicha continental, chucrute, azeitona, tofu, cheddar, stilton, brie, bebidas de leite fermentadas e manteiga, iogurte	NA	NA	<sup>c</sup>

**a-** A maioria dos produtos são normalmente estéreis quando é feita a amostragem, mas se estes são consumidos após preparação, analisar como a categoria 5. Estes produtos são “Não satisfatórios”, se existirem anaeróbios formadores de esporos, mas estes precisam de testes específicos para a sua deteção e enumeração. Aeróbios formadores de esporos também estão normalmente ausentes em alimentos que foram cozinhados na sua embalagem mas podem existir pequenos níveis em produtos de peixe enlatados.

**b -** Determinar o microrganismo predominante. É considerado “Insatisfatório” se o organismo predominante for > 10<sup>6</sup> leveduras, >10<sup>7</sup> Bacilos Gram negativos ou *Bacillus* spp., ou >10<sup>8</sup> bactérias ácido láctico.

**c -** Os Microrganismos Totais não são normalmente analisados nas categorias 9 a 13. Para investigação de alimentos estragados é considerado “Insatisfatório” se o organismo predominante for > 10<sup>6</sup> leveduras, >10<sup>7</sup> Bacilos Gram negativos ou *Bacillus* spp., ou >10<sup>8</sup> bactérias ácido láctico a não ser que tenham sido adicionados no processo de fabrico.

**NA** – Não aplicável

ANEXO 5. GUIA HONG KONG - CATEGORIAS DE ALIMENTOS DEFINIDOS PARA CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS DE MICROORGANISMOS TOTAIS (adaptado de [33]).

Produto	Categoria
<b>Carne</b>	
Hambúrguer	1
Kebabs	1
Dim sum	2
Pate (carne, peixe ou vegetais)	3
Aves de capoeira (sem ser fatiada)	2
Carne preservada	4
Salame e produtos de carne fermentados	5
Salsichas	2
Carne fumada	5
Siu-mei & lo-mei	3
Carne fatiada (presunto e língua) fria	4
Carne fatiada (carne vaca, porco, aves de capoeira)	3
Bifes e rins / tartes de carne	2
Tripas e outras miudezas	4
<b>Frutos do mar</b>	
Crustáceos	3
Peixes em salmoura	1
Outro peixe (cozinhado)	3
Ostras (cruas)	5
Refeições de peixe	3
Moluscos (cozinhados)	4
Peixe fumado	4
<b>Sobremesas</b>	
Bolos, pastelaria, fatias e sobremesas - com creme de pastelaria	3
Bolos, pastelaria, fatias e sobremesas - sem creme de pastelaria	2
Cheesecake	5
Mousse/sobremesas	1
Tortas, flans e tartes	2
Trifle	3

Produto	Categoria
<b>Condimentos</b>	
Tofu assado	5
Produtos de pastelaria com queijo	2
Alimentos fermentados	5
Flans, quiches	2
dips	4
Molhos/mayonaise	2
chamuças	2
satay	3
Rolinhos primavera	3
<b>Lactínicos</b>	
Queijo	5
logurte	5
<b>Vegetais</b>	
coleslaw/saladas (com ou sem carne)	3
Frutos e vegetais (secos)	3
Frutos e vegetais (frescos)	5
Arroz	3
Refeições com vegetais (cozinhada) e vegetais	2
<b>Refeições prontas a comer</b>	
Massa/pizza	2
Outras refeições	2
<b>sandwiches e rolos recheados</b>	
Com salada	4
Sem salada	3
<b>sushi &amp; sashimi</b>	
Sushi e sashimi com ovas de peixe e filetes de peixe	3
Outro sashimi	4

ANEXO 6. MICRORGANISMOS PATOGENICOS ALIMENTARES – ALIMENTOS ASSOCIADOS, PERÍODO DE INCUBAÇÃO, DOSE INFECCIOSA, SINTOMAS E DURAÇÃO DA DOENÇA DE ORIGEM ALIMENTAR.

Microorganismo		Alimentos Associados [36, 37, 75]	Período de Incubação [8, 36, 37, 76]	Duração [36, 37, 76]	Dose infecciosa [8, 37, 76]	Sintomas [8, 36, 37]
<i>Bacillus cereus</i> , intoxicação	Doença emética	Pratos com arroz cozinhado e deixado a temperaturas mornas por muito tempo ou arroz aquecido.	1 a 5 h	24 h	10 <sup>5</sup> a 10 <sup>8</sup> organismos	Náuseas, vômitos e cólicas abdominais
	Tipo diarreica	Carne cozinhada, arroz, cereais, sopa, vegetais	8 a 16 h			Diarreia moderada a severa, dor e cólicas abdominais
<i>Campylobacter</i> spp. <sup>a,b</sup>		Carne de aves crua ou mal cozinhada, leite mal pasteurizado ou não pasteurizado, água contaminada	2-5 dias	2 a 10 dias	<500 células	Febre, dores abdominais e musculares, diarreia profunda (às vezes com sangue), dores de cabeça, náuseas
<i>Clostridium perfringens</i>		Carne cozinhada, aves, vegetais, arrefecimento demasiado lento após cozinhar	8-24 h	24 h	>10 <sup>6</sup> células vegetativas ou >10 <sup>6</sup> esporos/g comida	Dores abdominais, diarreia, náuseas, raramente vômitos ou febre
<i>Escherichia coli</i> VTEC (O157) <sup>a,b,c</sup>		Carne crua ou mal cozinhada, contaminação cruzada entre carne crua e cozinhada, sumos não pasteurizados, leite e derivados não pasteurizados, vegetais crus, sementes germinadas	1 a 7 dias	2 a 9 dias	Estimado entre 10-100 células	Diarreia moderada aquosa, cólicas abdominais, colite hemorrágica. Vômitos ocasionais e febre é raro. Sintomas crónicos: Síndrome urémica hemolítica (HUS)
<i>Listeria monocytogenes</i> <sup>a,b,c</sup>		Carnes processadas e fatiadas, patés, leite cru, queijos, peixe cru ou fumado, alimentos prontos a comer, alimentos refrigerados, frutos ou vegetais crus	Poucas horas a alguns dias mas na forma mais invasiva pode levar semanas	Dias a semanas	Dose infecciosa varia muito com os hospedeiros mas pode ser muito baixa em indivíduos imunocomprometidos	Sintomas de gripe como febre, dor de cabeça e ocasionalmente sintomas gastrointestinais Forma Invasiva: Meningite, encefalite e abscessos, septicémia, abortos
<i>Salmonella</i> spp. <sup>a,b,c</sup>		Ovos, carne, aves, frutos do mar, rebentos crus, vegetais e frutos crus, sumos não pasteurizados, leite e derivados, peixe, camarão, cogumelos, chocolate, especiarias	6-72h	4 a 7 dias,	Pode ser 1 célula, mas varia com hospedeiro e os serotipos	Diarreia com água e fezes mucóides com sangue, náuseas, vômitos, febre de pouca duração, dores abdominais
<i>Salmonella typhi</i> e <i>Salmonella paratyphi</i> A-C <sup>a,b,c</sup>		Frutos e vegetais expostos a água contaminada, produtos lácticos, carne, marisco, vegetais, saladas, contaminação da comida por manuseamento ou ocasionalmente por pessoas assintomáticas	1 a 3 semanas	2 a 4 semanas	<1,000 células	Diarreia seguida de obstipação, febre alta persistente ou com picos, dores abdominais e de cabeça, náuseas, septicémia e sintomas sistémicos
<i>Shigella</i> spp. <sup>b,c</sup>		Vegetais e frutos crus, saladas, bivalves, marisco, frango, alimentos contaminados por pessoas infectadas via fecal-oral	1-4 dias (depende estirpe)	10 a 200 células	Poucos dias a poucas semanas	Dor abdominal, febre acompanhada com diarreia que pode ser aquosa ( <i>S. sonnei</i> ) a sintomas disentéricos
<i>Staphylococcus aureus</i> , intoxicação por enterotoxinas A e B <sup>a</sup>		Alimentos contaminados e sujeitos a abusos de temperatura-tempo antes de cozinhar, alimentos cozinhados e outros alimentos prontos a comer contaminados por manuseamento e refrigerados inadequadamente, carnes, aves e ovos, saladas com ovos, produtos de pastelaria	1-7 h (normalmente 2 a 4 h)	<1 µg da toxina	Até 2 dias	Vômitos, náuseas, dores abdominais, diarreia, suores, dor de cabeça, prostração, ocasionalmente desidratação severa que leva ao colapso

<b>Microorganismo</b>	<b>Alimentos Associados</b> [36, 37, 75]	<b>Período de Incubação</b> [8, 36, 37, 76]	<b>Duração</b> [36, 37, 76]	<b>Dose infecciosa</b> [8, 37, 76]	<b>Sintomas</b> [8, 36, 37]
<i>Vibrio cholerae</i> <sup>c</sup>	Peixe cru, marisco, arroz cozinhado, gelo, vegetais e fruta	Poucas horas a 3 dias	1 milhão de organismos	Poucos dias	Diarreia aquosa profunda, que pode levar a desidratação, colapso e morte em poucas horas
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> <sup>b</sup>	Frutos do mar crus ou cozinhados inadequadamente, ou sujeitos a contaminações cruzadas	4-90h	ID50 – 100 milhões organismos	2 a 6 dias	Diarreia aquosa profunda que leva a desidratação, dores abdominais, vômitos e febre
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>a,b</sup>	Produtos de porco inadequadamente cozinhados, vegetais crus, leite e derivados	1-11 dias	Estimado 10 <sup>4</sup> a 10 <sup>6</sup> organismos	Poucos dias a 3 semanas	Dores abdominais, febre, dor de cabeça, diarreia, mal-estar e vômitos
Hepatite A <sup>c</sup>	Marisco, fruta fresca e vegetais, alimentos prontos a comer contaminados por manuseamento, carne de porco	15 a 50 dias	Estimado 10-100 partículas virais	Semanas a meses	Sintomas iniciais são perda de apetite, febre, mal-estar, náuseas e vômitos, urina escura podendo levar a hepatite icterícia ou não icterícia
Norovirus	Marisco, fruta fresca e vegetais, alimentos prontos a comer contaminados por manuseamento (saladas, produtos de pastelaria, sandes, alimentos frios)	24 a 48 horas	1-10 partículas virais	2 dias	Febre baixa, Náuseas, vômitos, diarreia suave a moderada, dor de cabeça
<i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>b,c</sup>	Frutos e vegetais crus contaminados por água de irrigação, sumo e leite não pasteurizado, marisco, alimentos prontos a comer contaminados por manuseamento, água contaminada	7 a 10 dias	10 a 100 cistos	2 a 14 dias,	Diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos e febre, infecção pulmonar e traqueal associada a tosse. Podem surgir sintomas crónicos e recorrerem. A doença pode ser para toda a vida em doentes com imunodeficiência.
<i>Cyclospora cayentanensis</i> <sup>b,c</sup>	Frutos de bagas crus, saladas, ervas	7 a 10 dias	Desconhecido	Se não for tratado pode persistir dias a meses	Diarreia aquosa que pode durar 1-8 semanas, dores abdominais, inchaço
<i>Giardia duodenalis</i>	Frutos e vegetais crus contaminados por água de irrigação, leite não pasteurizado, alimentos prontos a comer contaminados por manuseamento,	1 a 2 semanas	1 ou mais cistos	2 a 6 semanas	Muitas vezes assintomáticos, Diarreia, dores abdominais, flatulência, perda de peso
<i>Toxoplasma gondii</i> <sup>a</sup>	Carne crua ou mal cozinhada, leite de cabra e de ovelha não pasteurizado, frutos e vegetais não lavados, contaminação do ambiente com oocistos das fezes de gatos (jardins ou caixas)	1 semana a 1 mês	-	-	Infecção assintomática ou ligeira com linfadenopatia. A consequência mais grave é a infecção congénita e o aborto em mulheres grávidas e o envolvimento cerebral em indivíduos imunocomprometidos.

a- Microorganismos monitorizados (zoonoses) no âmbito da directiva 2003/99/EC por Portugal e apresentados no relatório da ESFA anualmente

b- Microorganismos monitorizados pelo FoodNet -CDC

c- Microorganismos monitorizados NNDSS – National Notifiable Diseases Surveillance System - CDC

### Cálculo LOD<sub>50</sub>

#### 1. Estimativa de LOD<sub>50</sub>

$$LOD_{50} = e^m \quad \text{onde}$$

$$m = \sum_{i=1}^{k-1} (p_{i+1} - p_i)(x_i + x_{i+1})/2$$

Níveis (k)	tamanho amostra (g ou mL)	Nível de spiking x (ufc/amostra)*	replicados (n <sub>i</sub> )	x <sub>i</sub> = log x	nº replicados positivos em cada nível (sensibilidade)	proporção de positivos (p <sub>i</sub> )	p <sub>i+1</sub> -p <sub>i</sub> (a)	(X <sub>i</sub> +X <sub>i+1</sub> )/2 (b)	a*b	m	2,303*m
1	25	0,1	4	-1	0	0				0,000	0,00
2	25	1	4	0	2	0,5	0,5	-0,5	-0,25		
3	25	10	4	1	4	1	0,5	0,5	0,25		

Notas: Para o nível 1 que corresponde a zero de spiking, assumir valor de 0,1 ou 0,004 para permitir as contas  
Preencher **APENAS** campos a cinzento

#### 2. Estimativa do intervalo de confiança de 95% para o LOD<sub>50</sub> estimado

$$var(m) = \sum_{i=2}^{k-1} [(p_i(1 - p_i) / (n_i - 1))[(x_{i+1} - x_{i-1})/2]^2]$$

$$s = \sqrt{var(m)}$$

[p <sub>i</sub> (1-p <sub>i</sub> )/(n <sub>i</sub> -1)] (A)	[(x <sub>i+1</sub> -x <sub>i-1</sub> )/2] <sup>2</sup> (B)	A*B	var(m)	s
0,083333333	1	0,08333	0,083333	0,2887

#### 3. Resultado Final

$$LOD_{50} - 2,303 * 1,96s \quad - \quad LOD_{50} \quad - \quad LOD_{50} + 2,303 * 1,96s$$

limite inferior	-1,30304
limite superior	1,303045

Limite Inferior	LOD <sub>50</sub> (ufc/tamanho amostra)	Limite superior
0,27	1,00	3,68