

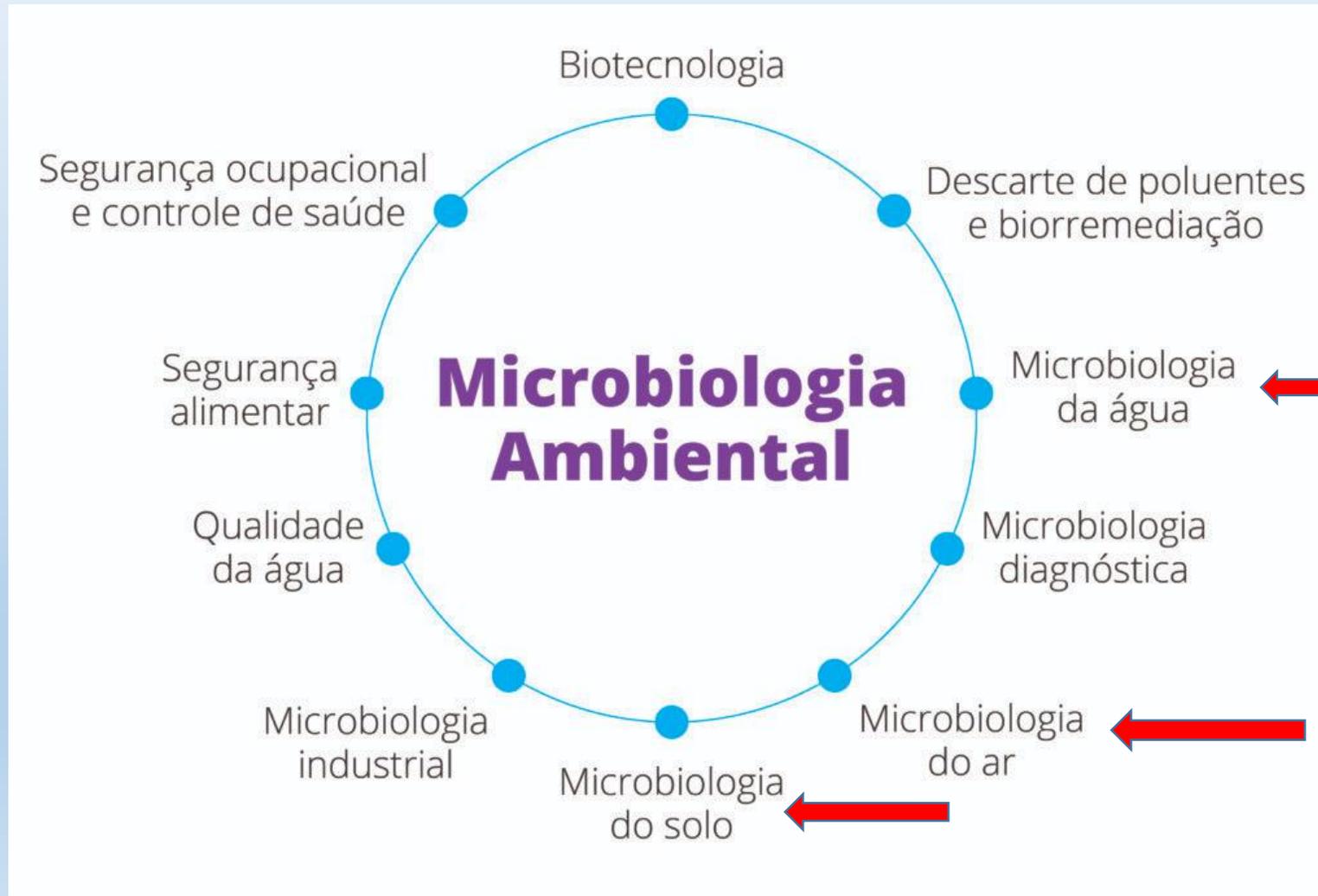
Detecção de agentes patogênicos no ambiente e em alimentos

Disciplina de Graduação da Faculdade de Saúde Pública – IMT2003

Thelma S. Okay – Profa. Associada do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP)

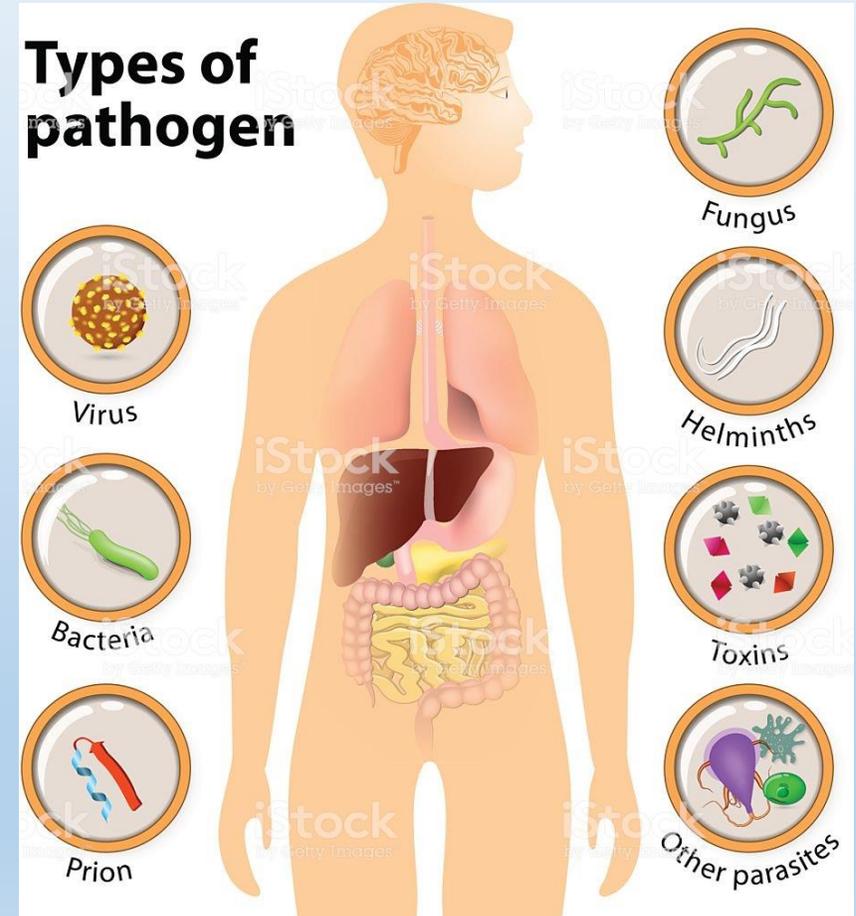
thelma.okay@usp.br

Microbiologia Ambiental



Agente patogênico

- **Agente patogênico** é um organismo, microscópico ou não, que produz infecção ou doenças infecciosas nos hospedeiros em condições favoráveis
- As bactérias, protozoários, fungos, helmintos e alguns artrópodes são exemplos de **agentes patogênicos**
- São também conhecidos como agentes infecciosos ou **agentes etiológicos**



Doença infecciosa X doença contagiosa

Doença infecciosa

- De acordo com OPAS (1983), à penetração e desenvolvimento ou multiplicação de um agente infeccioso no organismo de uma pessoa ou animal, dá-se o nome de infecção.
- A designação doença contagiosa é reservada para doenças infecciosas cujos agentes etiológicos atingem os sadios pelo contato direto desses com os indivíduos infectados (ex.: sarampo, DST).
- Toda doença contagiosa é infecciosa. O inverso não é verdadeiro (ex.: tétano - doença infecciosa transmissível não contagiosa)
- A expressão doença transmissível pode ser sintetizada como doença cujo agente etiológico é *vivo* e é *transmissível*. São doenças transmissíveis aquelas em que o organismo parasitante pode migrar do parasitado para o sadio, havendo ou não uma fase intermediária de desenvolvimento no ambiente.

Portador e disseminador

Alguns conceitos importantes...

- **PORTADOR** Indivíduo que **alberga um microrganismo** específico, sem apresentar quadro clínico atribuído ao agente e que serve como fonte potencial de infecção.
- **DISSEMINADOR** É o indivíduo que **elimina o microrganismo** para o meio ambiente. Pode se tornar um disseminador perigoso quando passa a ser fonte de surtos de infecção. Sendo um profissional de saúde, deve ser afastado das atividades de risco até que se reverta a eliminação do agente.



Infectividade, patogenicidade e virulência



Os bioagentes patógenos - propriedades

- **Infectividade:** capacidade que têm certos organismos de penetrar e de se desenvolver ou de se multiplicar no novo hospedeiro, ocasionando infecção. Nesse caso, o agente etiológico é também chamado de agente infeccioso. Ex.: vírus da gripe (alta) X fungos (baixa)
 - ✓ A doença infecciosa é um acidente na competição entre duas espécies (ao longo do tempo ocorrem modificações quantitativas e qualitativas)
- **Patogenicidade:** qualidade que tem o agente infeccioso de, uma vez instalado no organismo do homem e de outros animais, produzir sintomas em maior ou menor proporção dentre os hospedeiros infectados. Ex.: vírus do sarampo (alta) X vírus da poliomielite (baixa; 1% paralisia)

$$\text{patogenicidade} = \frac{\text{casos de doenças}}{N^{\circ} \text{ total de infectados}}$$

- **Virulência:** capacidade de um bioagente produzir casos graves ou fatais. Ex.: raiva humana X sarampo

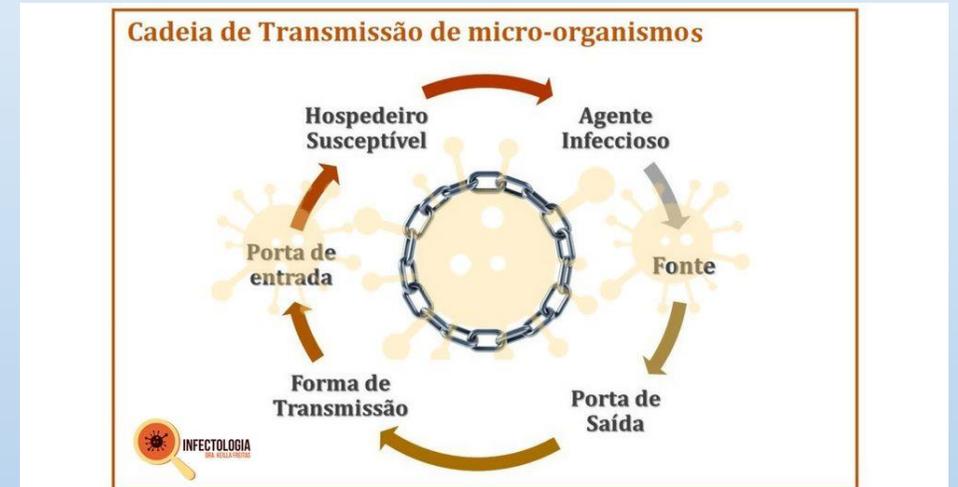
Transmissão do patógeno ou microrganismo

O processo de transmissão

- O segundo elo na cadeia de infecção é a transmissão ou difusão do agente infeccioso para o ambiente ou para outra pessoa.

Tabela 7.2. Modos de transmissão de um agente infeccioso

Transmissão direta	Transmissão indireta
Mãos	Veículos (alimentos contaminados, água, toalhas, instrumentos agrícolas, etc.)
Beijo	Vetores (insetos, animais)
Relação sexual	Aérea, longa distância (poeira, gotículas)
Outro contato (por exemplo, durante o parto, procedimentos médicos, injeção de drogas, amamentação)	Parenteral (injeção com seringas contaminadas)
Aérea, curta distância (via gotículas, tosse, espirro)	
Transfusão (sangue)	
Transplacentária	

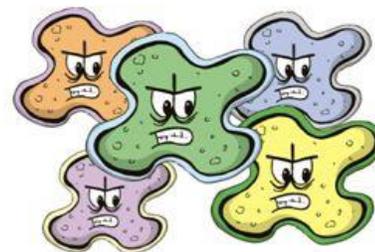


Fontes de contaminação



Noções de Microbiologia

- *Contaminação Física;*
- *Contaminação Química;*
- *Contaminação Biológica.*



- *Microorganismos Deteriorantes;*
- *Microorganismos Patogênicos;*



Contaminação do ambiente

- Ambientes passíveis de contaminação: **água, solo e ar**
- Dentre os principais poluentes do **ar**, podemos citar a **fumaça, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, ozônio, dióxido de nitrogênio e monóxido de carbono**
- A contaminação da **água** pode ocorrer de várias maneiras, destacando-se a poluição por **esgoto, metais pesados, substâncias químicas, agrotóxicos e fertilizantes**. Além dos problemas causados por **organismos patogênicos**
- A contaminação do **solo** ocorre através de substâncias capazes de provocar alterações significativas em sua estrutura natural: **lixo, esgoto, agrotóxicos e outros tipos de poluentes**. Durante o processo de **decomposição de restos de alimentos**, ocorre a produção de gases e de chorume, líquido extremamente poluente e com forte odor que infiltra o solo, causando a sua contaminação, além de atingir o lençol freático (água subterrânea)

Contaminação da água

Qualidade da água

➤ Características de um indicador ideal

- **Epidemiológica** – relação existente entre o indicador, a taxa e a probabilidade de aparecimento de infecção numa população
- **Ecológica** – o indicador deve ser sempre encontrado nos dejectos de animais de sangue quente e estar sempre ausente em ambientes não poluídos
- **Bacteriológica** – o indicador deve ser mais resistente aos agentes desinfectantes que os patogénicos
- **Técnica** – detecção fácil e rápida, baixo custo



Causas e fontes de contaminação da água

CAUSAS

- Descarte de resíduos agrícolas em rios
- Contaminação dos lençóis freáticos por aterros sanitários
- Vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo de gasolina
- Rejeitos de aterros industriais
- Despejo de esgoto sem tratamento

FONTES DE CONTAMINAÇÃO

- Lixões
- Aterros mal operados
- Acidentes com substâncias tóxicas
- Atividades inadequadas de armazenamento, manuseio e descarte de matéria-prima, de produtos, efluentes e resíduos provenientes de atividades industriais, tais como indústrias químicas

Análises físico-químicas da água

- Titulométricas: alcalinidade, gás carbônico livre, cloretos, dureza total, pH
 - Dureza: é a propriedade relacionada com a concentração de íons de determinados minerais dissolvidos nesta substância ou mais especificamente as águas duras contém sais de cálcio e de magnésio em concentrações relativamente elevadas. A dureza da água é predominantemente causada pela presença de sais de cálcio e magnésio, de modo que os principais íons levados em consideração são os de cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}). Eventualmente também o Zinco, Estrôncio, Ferro ou Alumínio podem ser levados em conta na aferição da dureza
- Colorimétricas: cloro residual livre, cloro ativo, cor, alumínio, turbidez, temperatura, fluoretos, ensaio de coagulação (Jar test)
 - Jar test: processo de floculação (formação de flocos), no qual ocorre a agregação ou a reunião de partículas já desestabilizadas na etapa de coagulação. O agente coagulante $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]$ deve ser misturado na água, sendo a mistura feita em flocladores



Métodos de cultura de patógenos



Algumas doenças veiculadas pela água e seus agentes

Algumas doenças veiculadas pela água e seus agentes

Doenças	Agentes patogênicos
Origem bacteriana	
Febre tifóide e paratifóide	<i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi A e B</i>
Disenteria bacilar	<i>Shigella sp</i>
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Gastroenterites agudas e diarreias	<i>Escherichia coli enterotóxica</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolítica</i> <i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i>
Origem viral	
Hepatite A e B	Vírus da hepatite A e B
Poliomielite	Vírus da poliomielite
Gastroenterites agudas e crônicas	Vírus Norwalk Rotavírus Enterovírus Adenovírus
Origem parasitária	
Disenteria amebiana	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giárdia lâmblia</i>
Gastroenterites	<i>Cryptosporidium</i>

Fonte: Opas, 1999

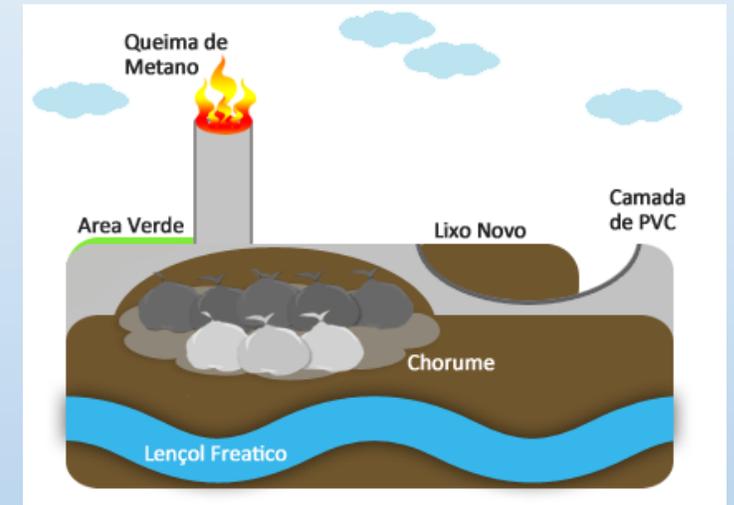
MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS NA ÁGUA

Fungos

- aquáticos: saprófitas, parasitas de peixes
- oriundos do solo: leveduras
 - *Candida albicans*: infecções da pele, mucosas
- fungos dermatófitos
 - *Geotrichum*

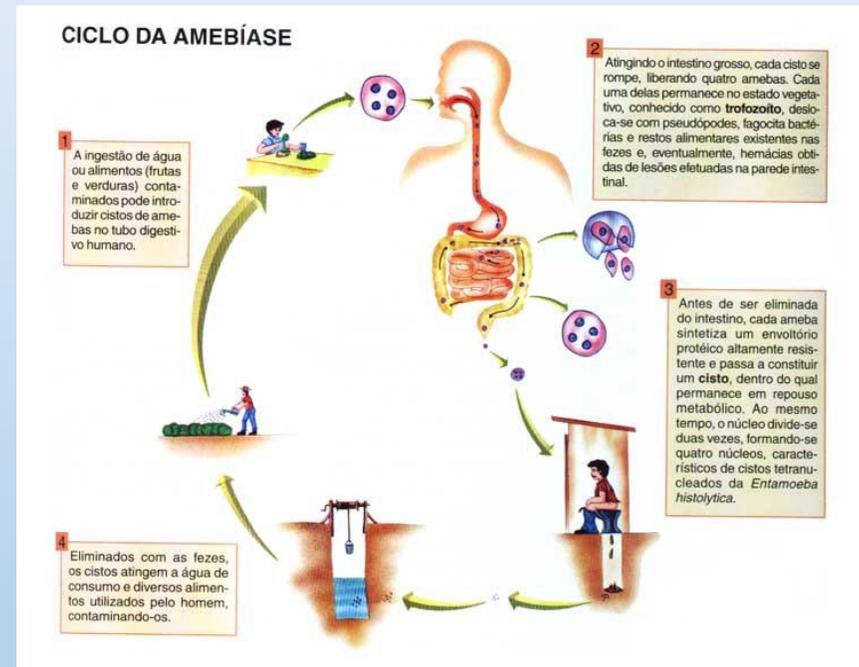
Contaminação do solo

- A **contaminação do solo** pode ser de origem humana (fezes), agrícola (agrotóxicos etc), industrial e ocorre por intermédio de agentes químicos, rejeitos sólidos ou líquidos, resíduos industriais e proliferação de patógenos (microrganismos e parasitos)
- **Consequências:** solo se torna infértil, saturação do solo, deposição ou infiltração no solo ou no subsolo de substâncias ou produtos poluentes, contaminação do solo com metano e dióxido de carbono, perda das funções e qualidades do solo devido à introdução de poluentes, alteração da tipografia, perda da fauna, alteração da densidade e da consistência do solo, alteração da aptidão para drenagem natural, alteração do solo em profundidade, alterações da qualidade da água, deposição com impregnação de líquidos poluentes, aplicação direta de resíduos da terra, como por exemplo lama de esgoto, produção e migração de gás nos aterros conduzindo ao aumento de temperatura dos solos



Principais doenças transmitidas pelo solo contaminado

- O principal contaminante do solo que afeta a saúde humana são as **fezes humanas**
- **Tétano**: doença causada pela bactéria *Clostridium tetani* presente no solo, poeira e estrume. As bactérias geralmente penetram no organismo através de uma abertura na pele feita por objeto contaminado
- **Toxoplasmose**: doença causada por parasito protozoário que pode ser adquirida pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos do parasito, pela inalação de poeira contendo oocistos parasitários ou ainda pelo contato direto com fezes de felinos jovens contendo cistos e oocistos
- **Amebíase**: causada pelo parasito *Entamoeba histolytica*, que entra no organismo por meio da ingestão de água ou comida contaminadas ou pelo contato direto com a matéria fecal
- **Ascaridíase**: doença parasitária causada pelo verme *Ascaris lumbricoides*. A infecção ocorre através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados fezes contendo ovos de *Ascaris*



Principais doenças transmitidas pelo solo contaminado

- **Ancilostomíase:** infecções causadas por parasitos intestinais da família dos ancilostomídeos. As duas infecções mais comuns entre seres humanos são a ancilostomíase, causada pela espécie *Ancylostoma duodenale*, e a necatoríase, causada pela espécie *Necator americanus*. A infecção ocorre através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados fezes contendo ovos do parasito. Lembrar que as larvas que aparecem após a eclosão dos ovos são capazes de penetrar a pele
- **Teníase (solitária):** infecção intestinal ocasionada principalmente por dois grandes parasitos hermafroditas da classe dos cestódeos da família Taenidae, conhecidos como *Taenia solium* e *Taenia saginata*. A teníase ocorre devido a presença de *Taenia solium* adulta ou *Taenia saginata* dentro do intestino delgado dos humanos, que são os hospedeiros definitivos
- **Cisticercose:** infecção do tecido causada pela forma jovem da tênia da carne de porco. É adquirida pela ingestão de alimentos ou água contaminada por ovos de tênia provenientes de fezes humanas



Indicador de contaminação fecal: requisitos

REQUISITOS BÁSICOS DE UM INDICADOR DE CONTAMINAÇÃO FECAL

- ◆ Deve ser constituído por uma bactéria ou um grupo de bactérias prevalente em esgoto e excretado pelo homem e outros animais homeotérmicos
- ◆ Sua densidade deve ter uma relação direta com o grau de contaminação fecal
- ◆ Deve ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático
- ◆ Deve apresentar maior resistência aos desinfetantes que as bactérias patogênicas
- ◆ Deve ser quantificável por métodos laboratoriais rápidos e simples
- ◆ Deve ser útil para todos os tipos de água

Indicadores de contaminação fecal

Emprego dos Organismos Indicadores de Contaminação Fecal

- O indicador mais preciso da qualidade da água para consumo humano é a ***E. coli***, seguido, dos coliformes termotolerantes. Em qualquer situação, ambos não devem estar presentes na água. O emprego do termo coliformes fecais deve ser evitado e substituído por **coliformes termotolerantes**.
- Coliformes totais não são indicadores adequados da qualidade sanitária de águas *in natura*.
- A simples presença de coliformes totais no sistema de distribuição serve como alerta para o desencadeamento de medidas corretivas.
- Sempre que possível ou necessário, quando do isolamento de coliformes totais e termotolerantes, sugere-se a realização de ensaios confirmativos até o isolamento de *E. coli*, acompanhada de inspeções sanitárias ⇒ **Portaria N°518/2004, Min.Saúde.**

Exame parasitológico de fezes

PARASITOLÓGICO DE FEZES

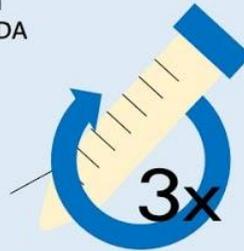
MÉTODO DE FAUST

AMOSTRA CHEGA EM RECIPIENTE PRÓPRIO

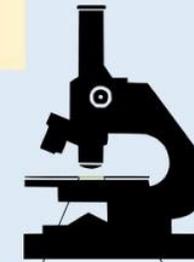


AS FEZES SÃO DILUÍDAS EM ÁGUA DESTILADA

O MISTURADO É CENTRIFUGADO ATÉ OBTER UM LÍQUIDO CLARO



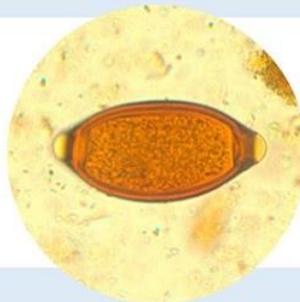
UMA ALÇA É USADA PARA COLETAR A PELÍCULA QUE SE FORMA E POSTO EM LÂMINA, CORADO COM LUGOL E VISTO AO MICROSCÓPIO



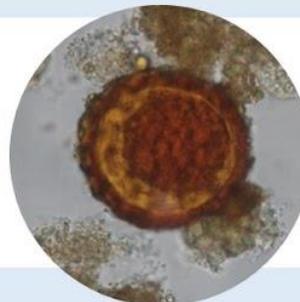
OVO DE *Taenia* sp.



OVO DE *Schistosoma mansoni*



OVO DE *Trichuris* sp.



OVO DE *Ascaris* sp.



Giardia sp.

VISÃO GERAL



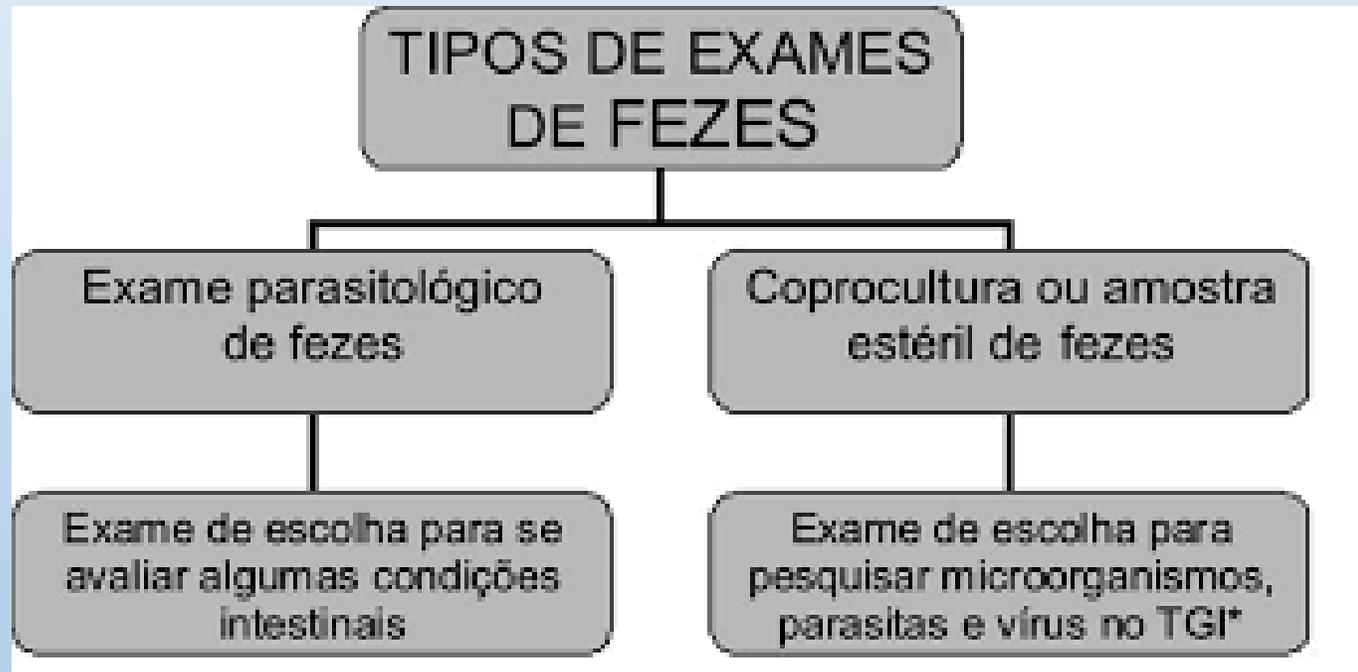
DIVERSOS PARASITAS INTESTINAIS DÃO SINAIS DE SUA EXISTÊNCIA POR MEIO DE MATERIAIS QUE ELES LIBERAM JUNTO COM AS FEZES. EXAMES SIMPLES PODEM DETECTAR A PRESENÇA DELES E INDICAR O MELHOR TRATAMENTO.

EXISTEM DIVERSAS TÉCNICAS PARA ANÁLISE DAS FEZES ALÉM DO MÉTODO DE FAUST, CADA UM FACILITANDO O DIAGNÓSTICO DE UM TIPO DE PARASITA. OS EXEMPLOS ACIMA FORAM OBTIDOS UTILIZANDOSE DE VÁRIAS TÉCNICAS.

GIARDIA: BIOMEDICINA PADRÃO
ASCARIS: USJT
TRICHURIS: CDC
SCHISTOSOMA: USJT
TAENIA: WADSWORTH
DIVULGAÇÃO.

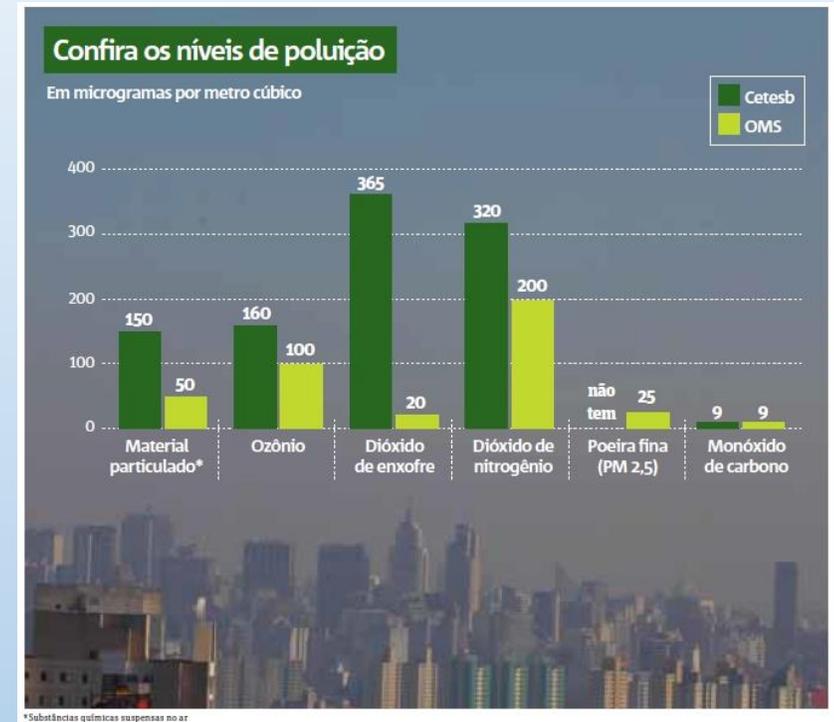


Coprocultura



Principais doenças causadas pelo ar contaminado

- **Poluentes do ar:** fumaça, partículas inaláveis, dióxido de enxofre, ozônio, dióxido de nitrogênio e monóxido de carbono causando sobretudo doenças respiratórias desde conjuntivites, rinites e sinusites até asma, bronquite, pneumonia
- **Medidas preventivas:** incentivar o uso do transporte público em grandes cidades, de instrumentos que minimizem as emissões de poluentes, como catalisadores automotivos, filtros nas fábricas e usinas, tratamento de resíduos etc. Promover o controle e a fiscalização das queimadas em lavouras, áreas de pastagens e em regiões de cobertura vegetal natural. Incentivar a criação e ampliação de áreas verdes



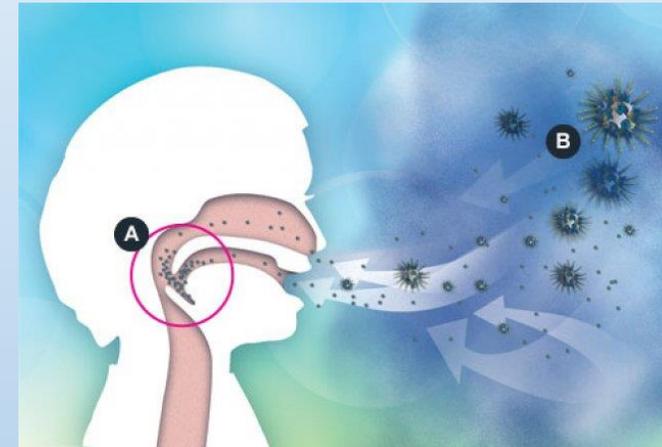
A inalação destes poluentes causa irritação e inflamação das vias aéreas, favorecendo a ocorrência de infecções

Doenças transmitidas pelo ar



Infecções Transmitidas pelo ar

- São aquelas que ocorrem pela entrada do microorganismo no aparelho respiratório, resultado do contato direto com gotículas contaminadas
 - Coqueluche
 - Difteria
 - Meningite
 - Pneumonia
 - Tuberculose



Agentes patogênicos transmitidos pelo ar

Grupo	Ácido nucleico	Tipos	Síndrome clínica
Adenovírus	DNA	I - 47	Resfriado comum, faringite, laringite, bronquite, bronquiolite, febre faringoconjuntival, doença respiratória aguda em recrutas militares, pneumonia
Coronavírus	RNA	229E, OC43, huCoV-SARS	Resfriado comum, faringite, laringite, bronquite, SARS
Hantavírus Orthomixovírus Vírus da influenza	RNA	Múltiplos A,B,C	SARA, pneumonia Influenza, resfriado comum, faringite, laringite, crupe, bronquite, bronquiolite, pneumonia
Paramyxovirus Vírus do Sarampo Vírus parainfluenza	RNA	I - 4	Sarampo, pneumonia, bronquiectasia Resfriado comum, faringite, laringite, crupe, bronquite, bronquiolite, pneumonia
VSR		A, B	Resfriado comum, faringite, crupe, bronquite, bronquiolite, pneumonia
Metapneumovírus humano Picornavírus Enterovírus Coxsackie vírus Echovírus Rinovírus Herpes vírus Herpes simplex vírus	RNA DNA	A, B I - 24 I - 34 I - 100	Resfriado comum, bronquiolite Resfriado comum, SARA, herpangina Resfriado comum Resfriado comum, laringite, bronquite
Citomegalovírus		I, 2	Faringite aguda, faringite ulcerativa crônica, traqueíte, bronquite, pneumonia em imunossuprimidos
Vírus varicela zoster		I	Mononucleose, faringite aguda e crônica, pneumonia em imunossuprimidos
Vírus Epstein-Barr		I	Pneumonia
Vírus herpes humano 6		I	Mononucleose, faringite aguda e crônica Pneumonia em imunossuprimidos

Vírus

DNA = ácido deoxirribonucleico; RNA = ácido ribonucleico; VSR = vírus sincicial respiratório; SARA = síndrome da angústia respiratória do adulto; SARS = síndrome respiratória aguda grave (*severe acute respiratory syndrome*).

Bactérias e fungos transmitidos pelo ar

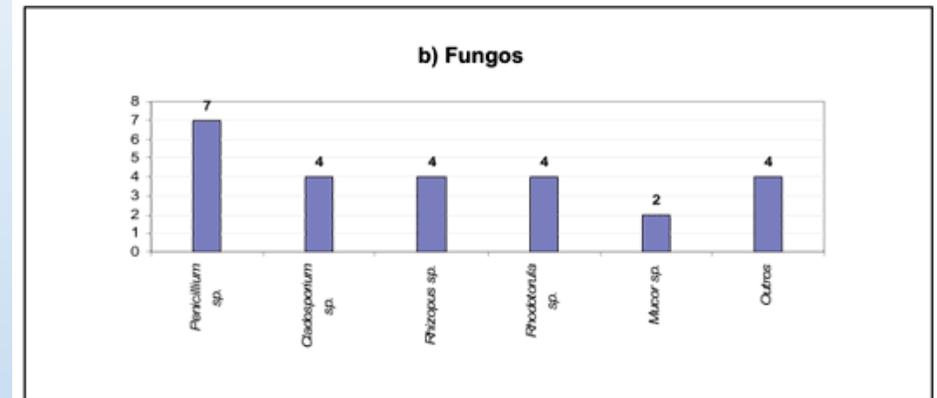
PRINCIPAIS TIPOS DE MICRORGANISMOS:

- **Fungos predominantes:**

- *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, *Pullularia sp* e *Agaricus sp* ;
- esporos de bolores constituem a maior parte da microbiota aérea.

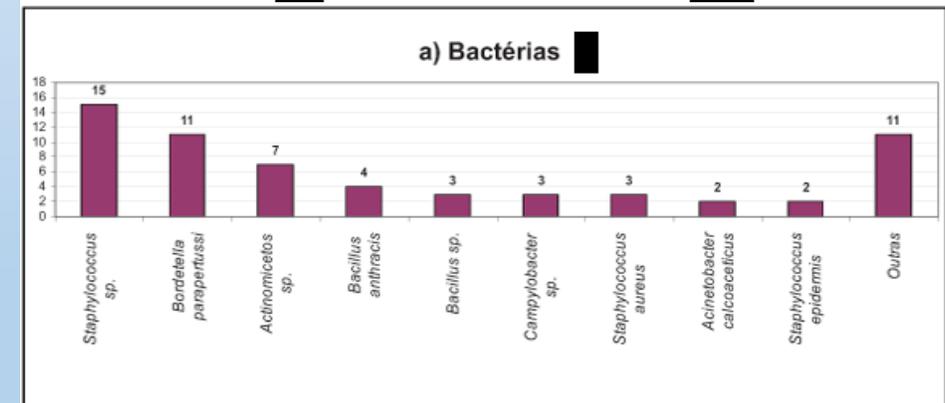
- **Bactérias:**

- Bacilos gram-positivos esporulados (*Bacillus sp*) e não-esporulados (*Kurthia sp*), bacilos gram-negativos (*Alcaligenes sp*) e cocos gram-positivos (*Micrococcus sp* e *Sarcina sp*).



Fonte: Pesquisa CAEMA, 2004

Figura 4 - Ocorrência de Fungos⁶



Fonte: Pesquisa CAEMA, 2004

Figura 3 - Ocorrência de bactérias⁶

Doenças respiratórias transmitidas pelo ar e óbitos

PRINCIPAIS DOENÇAS CAUSADAS POR MICRORGANISMOS PRESENTES NO AR

Tabela 25.1 Mortas mundiais causadas por doenças infecciosas, em 1999

Doença	Mortes	Agentes causadores
Infecções respiratórias agudas* ^a	4.000.000	Bactérias, vírus, fungos
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)	2.700.000	Vírus
Doenças diarreicas	2.200.000	Bactérias, vírus
Tuberculose*	1.700.000	Bactérias
Malária	1.100.000	Protozoários
Sarampo*	875.000	Vírus
Tétano*	377.000	Bactéria
Coqueluche (tosse comprida)*	295.000	Bactéria
Meningite bacteriana*	171.000	Bactéria
Sífilis	153.000	Bactéria
Hepatite (todos os tipos)* ^b	124.000	Vírus
Tripanossomíase (doença do sono)	66.000	Protozoário
Leishmaniose	57.000	Protozoário
Infecções por clamídias	16.000	Bactéria
Infecções intestinais por nematóides	16.000	Vermes parasitas
Esquistossomose	14.000	Verme parasita
Dengue	13.000	Vírus
Outras doenças transmissíveis	1.700.000	

Cerca de 56 milhões de mortes ocorreram ao redor do mundo, devido a várias causas. Destas, aproximadamente 15,6 milhões foram decorrentes de doenças infecciosas, praticamente todas nos países em desenvolvimento. Dados obtidos da Organização Mundial de Saúde (OMS), Genebra, Suíça.

* Doenças contra as quais existem vacinas eficazes.

a Contra alguns agentes respiratórios agudos, tais como o da gripe e *Streptococcus pneumoniae*, existem vacinas eficazes; para outros, tais como resfriados, não existem vacinas.

b Existem vacinas contra os vírus da hepatite A e da hepatite B. Não existem vacinas contra outros agentes de hepatite.

Microrganismos no ar: limites

LIMITES ACEITÁVEIS DE MICRORGANISMOS NO AR

Bioaerossóis	menos de 1.000 UFC/m ³ (OSHA*: Field Technical Manual)
Amostras de superfície	menos de 100 UFC/in ² ** em dutos de ventilação (NADCA***)
Ar interno	750 UFC/m ³ (fungos) (ANVISA****, Resolução (RE) Nº 9 de 2003. Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatiza dos artificialmente de uso público e coletivo.
Ambientes hospitalares	CP 109, 2003 ANVISA

*OSHA = Occupational Safety & Health Administration, U.S. Department of Labor

**UFC = Unidades formadoras de colônia por metro cúbico

*** NADCA = National Air Duct Cleaners Association, USA

**** ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil

Fonte: www.eagleih.com/microbiology.html

Prevenção de vírus respiratórios

CUIDADOS BÁSICOS

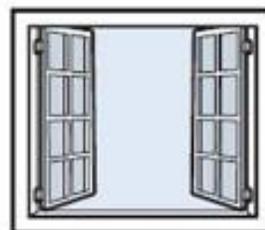
Com a chegada do frio aumentam os casos de transmissão do vírus H1N1, causador da gripe A. A população pode evitar que a doença se alastre tomando alguns cuidados básicos de higiene:



Mantenha hábitos saudáveis: coma bem, durma o suficiente e faça exercícios.



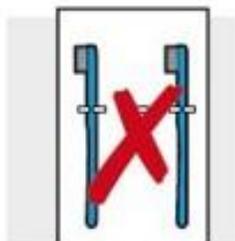
Evite ficar em locais fechados com grande aglomeração de pessoas.



Melhore a circulação de ar abrindo as janelas.



Evite tocar os olhos, a boca e o nariz após o contato com superfícies.



Não compartilhe objetos de uso pessoal.



Lave as mãos regularmente com água e sabão ou use álcool gel.



Cubra a boca e o nariz com um lenço ao tossir ou espirrar.



Evite contato direto com pessoas, se estiver com alguma doença respiratória que possa ser transmitida.



Limpe as superfícies lisas (mesas, telefones, maçanetas e teclados) com álcool líquido.

Lavagem de mãos

Higiene

O QUE O HÁBITO DE LAVAR AS MÃOS PODE EVITAR

PRINCIPAIS DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS E BACTÉRIAS*

(*). Dados da pesquisa "Custo das Doenças do Dia a Dia", feita em parceria com a Escola de Higiene Tropical de Londres

33,3% Respiratórias

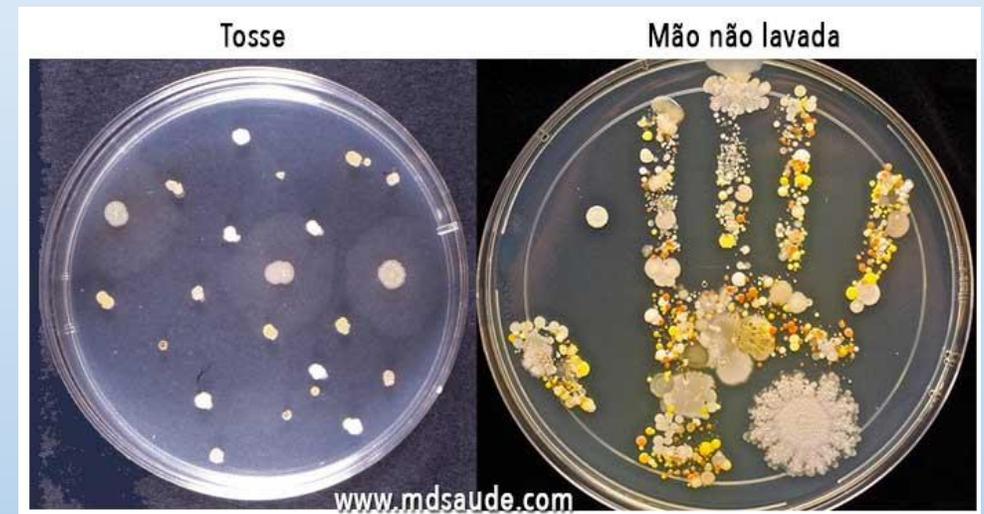
11,8% Diarreias

7,4% Infecções de pele

COMO LAVAR AS MÃOS CORRETAMENTE

- 1** Molhe as mãos e aplique sabonete em toda sua extensão
- 2** Ensaboe e esfregue ambas as palmas, sem pressa, contando até 20
- 3** Ensaboe as costas das mãos e esfregue entre os dedos
- 4** Esfregue o dorso dos dedos e lave os polegares com ajuda das palmas das mãos
- 5** Enxágue as mãos com água e evite contato direto com a torneira
- 6** Seque com uma toalha limpa ou papel toalha

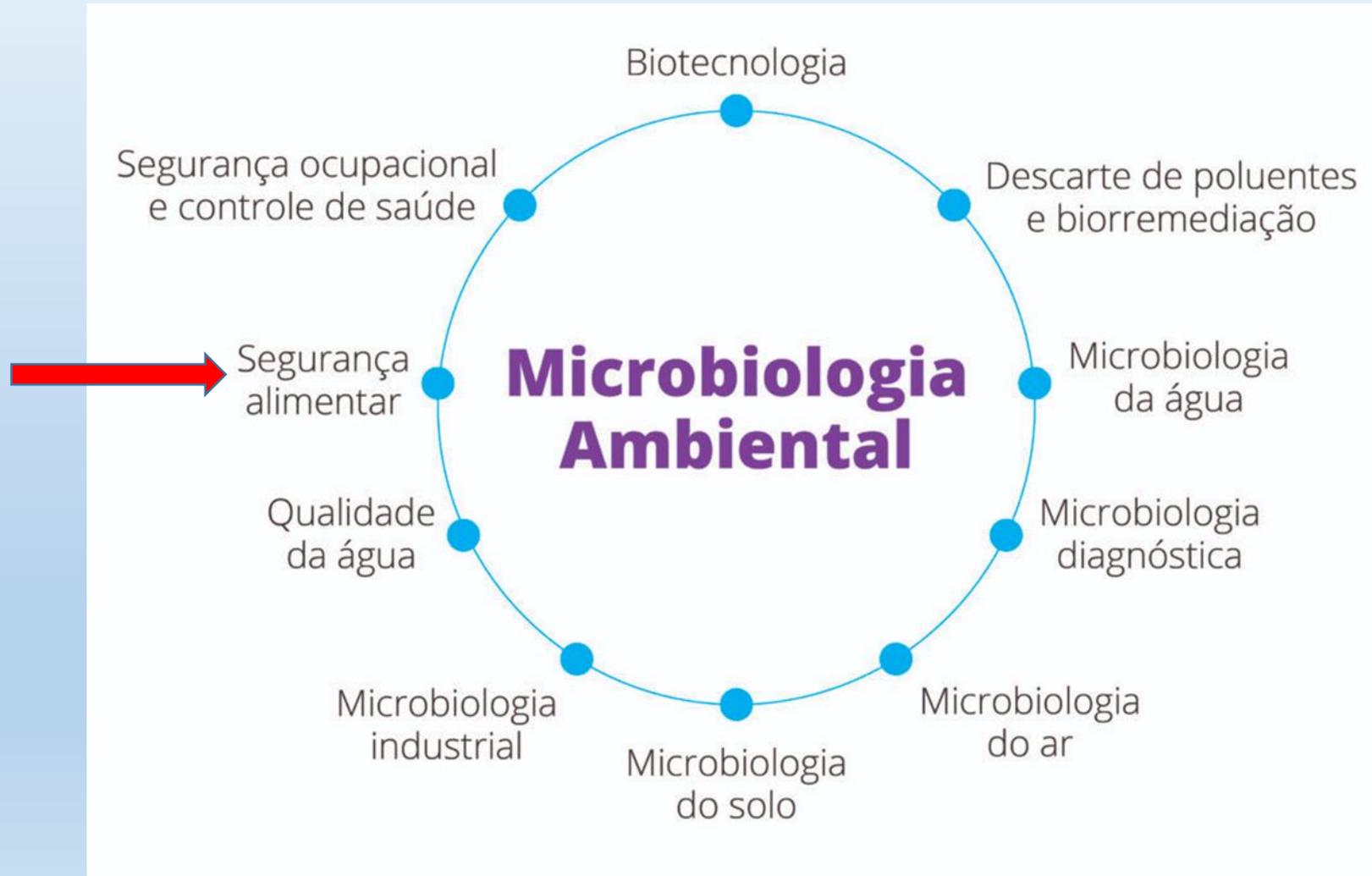
Fonte: Ascom/Ministério da Saúde, OMS, Lifebuoy



Vacinação



Microbiologia ambiental



Agentes patogênicos em alimentos

ORIGEM DOS MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS PRESENTES NOS ALIMENTOS

- Podem ser:
 - **Endógenos:**
 - Já estão presente dentro das estruturas dos alimentos.
 - Podem provocar enfermidades animais e vegetais transmitidas ou não ao homem. Ex: *Enterococcus*, *Salmonella*, *Listeria* sp, *Campylobacter* spp
 - **Exógenos:**
 - Se incorporam ao alimento durante sua manipulação e processamento.
 - Podem ser agentes patogênicos ou dos alterantes (saprófitos).

Tipos de contaminação de alimentos

EDITORIA DE ARTE / O TEMPO

TIPOS DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS

Física Presença de corpos estranhos – pedras, madeira, cabelo, pregos, giletes, fragmentos de insetos etc. – nos alimentos

Química Presença de compostos químicos estranhos ou de toxinas produzidas por micro-organismos nos alimentos – inseticidas, metais pesados e medicamentos

Biológica Presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos, como bactérias, parasitas, vírus (como da hepatite) e animais venenosos (moluscos, peixes, mexilhões)



Cuidados preventivos

- ◆ A água para consumo e preparo dos alimentos precisa ser filtrada. Caso não seja, deve ser fervida para eliminar resíduos e micro-organismos
- ◆ Lave muito bem frutas e verduras para evitar contato com micro-organismos, ovos de vermes ou resíduos de agrotóxicos
- ◆ O cozimento das carnes elimina as possíveis larvas de parasitas
- ◆ Lave com sabão e água corrente os utensílios usados para preparar e servir os alimentos – panelas, pratos, talheres e copos
- ◆ Antes das refeições, lave as mãos com sabão para evitar doenças graves como a cólera e as verminoses

Veículos mais frequentes e respectivos patógenos

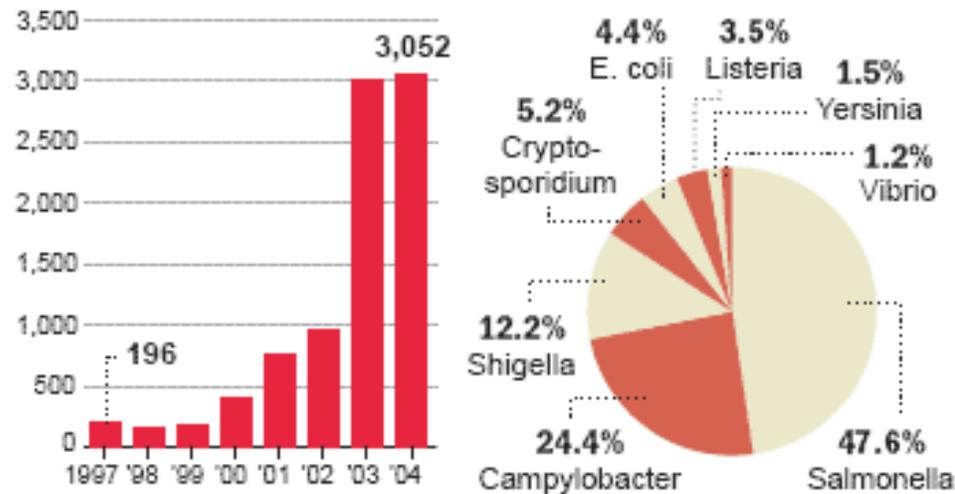
Veículo	Patógeno clássico
Água	<i>Vibrio cholerae</i> , Norwalk, <i>Giardia sp.</i> e <i>cryptosporidium</i>
Alimentos	
Aves domésticas	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> e <i>Shigella sp.</i>
Carne bovina	<i>E. coli</i> enteroemorrágica, <i>Taenia saginata</i>
Carne suína	<i>Taenia solium</i>
Frutos do mar	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio vulnificus</i>
Queijo	<i>Salmonella sp.</i>
Ovos	<i>Listeria sp.</i>
Maionese	<i>Salmonella sp.</i>
Tortas	<i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia sp.</i>
Zoonoses	Maioria das bactérias, vírus e parasitas entéricos
Interpessoal	
Creches	<i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> , vírus, <i>Clostridium difficile</i>
Hospital/antibióticos	<i>Clostridium difficile</i>
Piscina	<i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium sp.</i>
Viagem	<i>E. coli</i> de vários tipos, <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Giardia</i> e <i>Cryptosporidium sp.</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>

Bactérias mais frequentes nas intoxicações alimentares

Salmonella tops food-borne illnesses

Among all food-borne illnesses, salmonella is the chief bacteria that has caused more people to be hospitalized.

Number of persons hospitalized due to food-borne illnesses and ... percentage of 2004 hospitalizations by pathogen

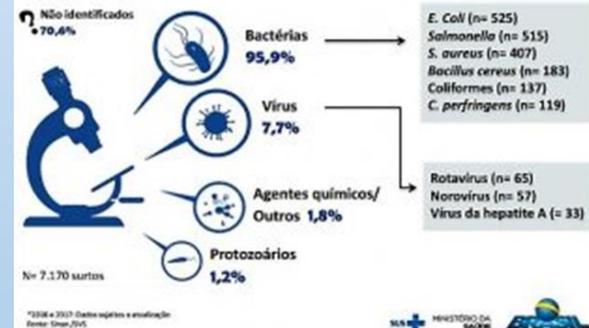


SOURCE: Centers for Disease Control and Prevention

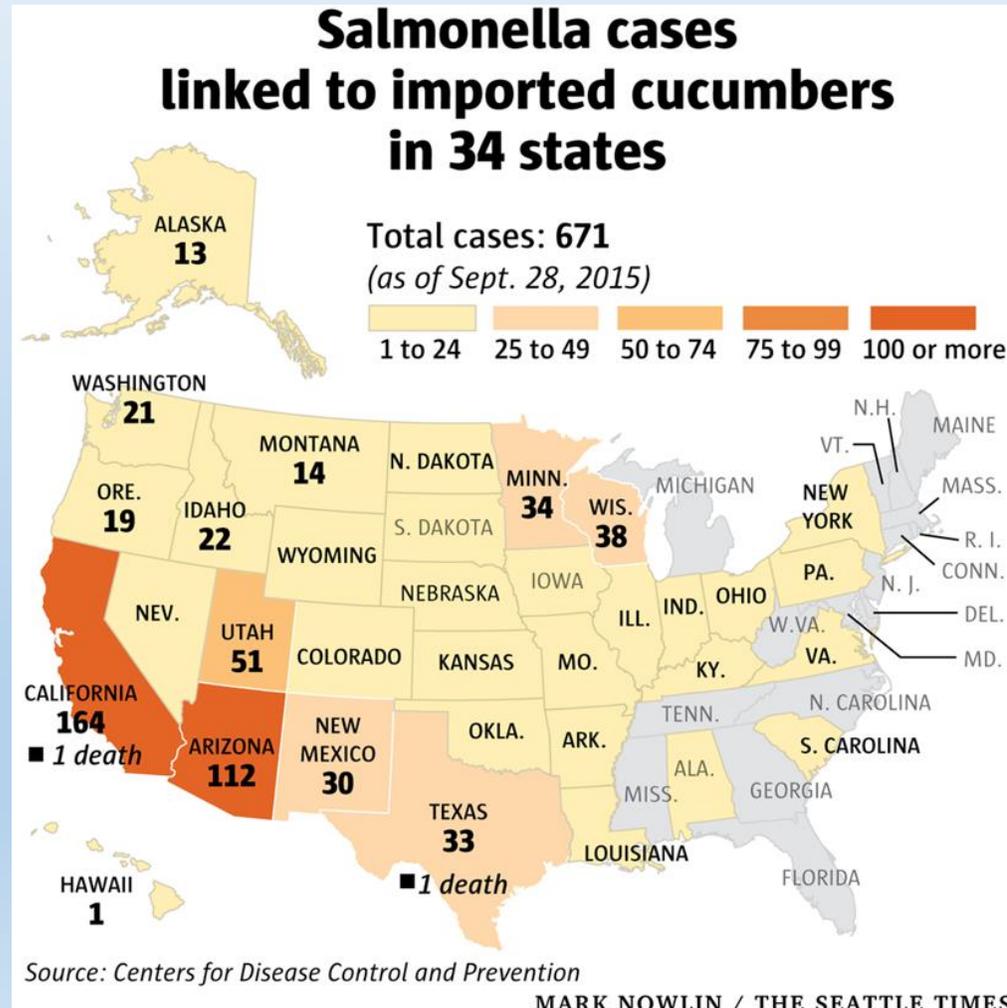
AP

Perfil Epidemiológico

Proporção de agentes etiológicos identificados nos surtos de DTA, Brasil, 2007 a 2017*.



Surto de salmonelose nos EUA devido à contaminação de pepinos importados



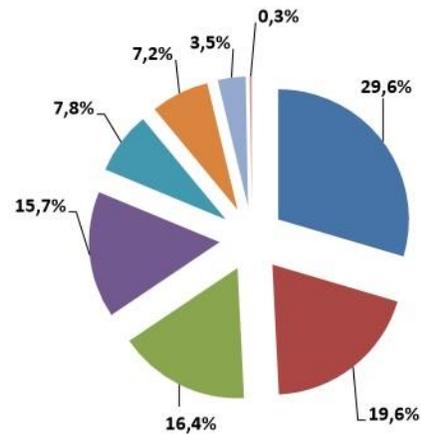
Staphylococcus aureus

Perfil Epidemiológico



Sinais e sintomas

Brasil, 2007 a 2016*

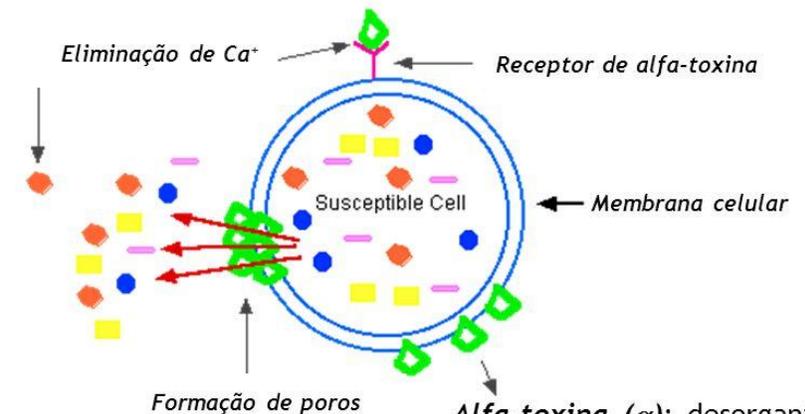


- Diarreia
- Dor abdominal
- Vômitos
- Náuseas
- Cefaléia
- Febre
- Outros
- Neurológicos

*Dados sujeitos a atualização
Fonte: Sinan /SVS

Staphylococcus aureus

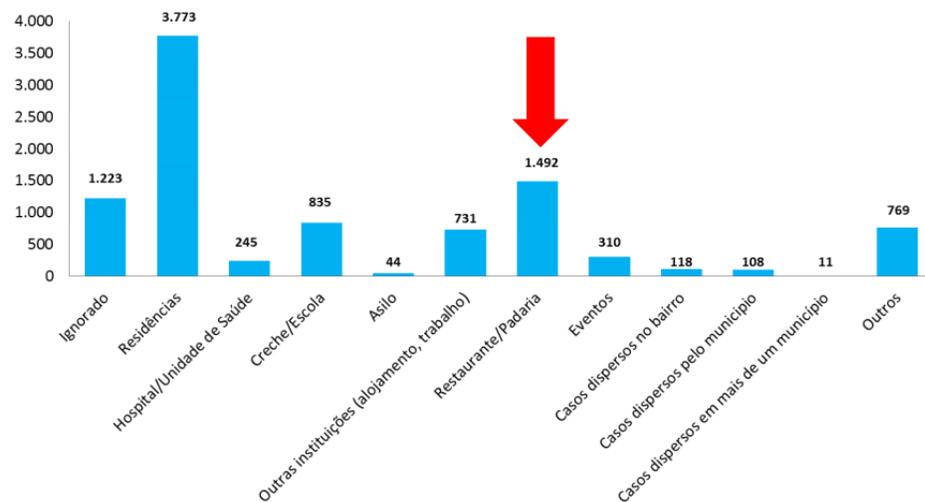
- 📄 Produção de **Coagulase**
- 📄 Produção de **Toxinas Citolíticas (Hemolisinas)**



Alfa-toxina (α): desorganiza a musculatura lisa, causando lesões teciduais e subcutâneas;

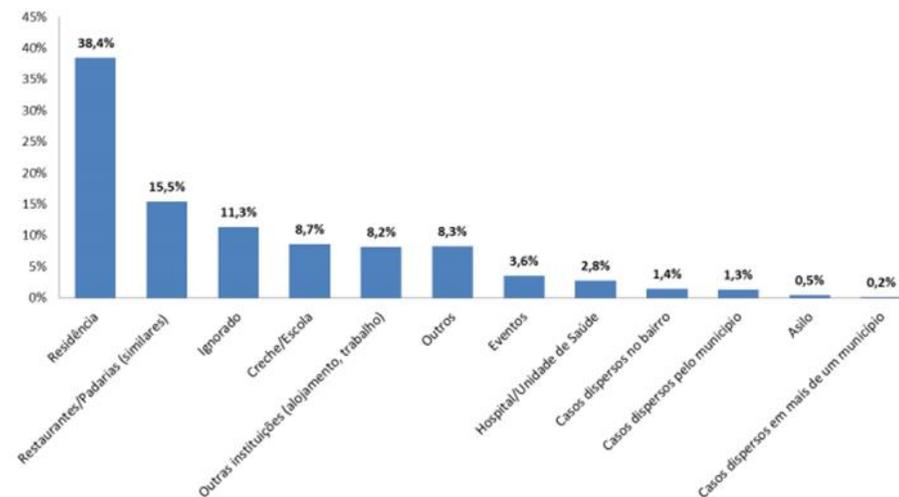
Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no Brasil

Local de ocorrência de surtos de DTA.
Brasil, 2000-2014*.



Fonte: Sinan Net/SVS/MS *Dados sujeitos a alteração

Distribuição dos surtos de DTA por local de ocorrência.
Brasil, 2000 a 2015*.



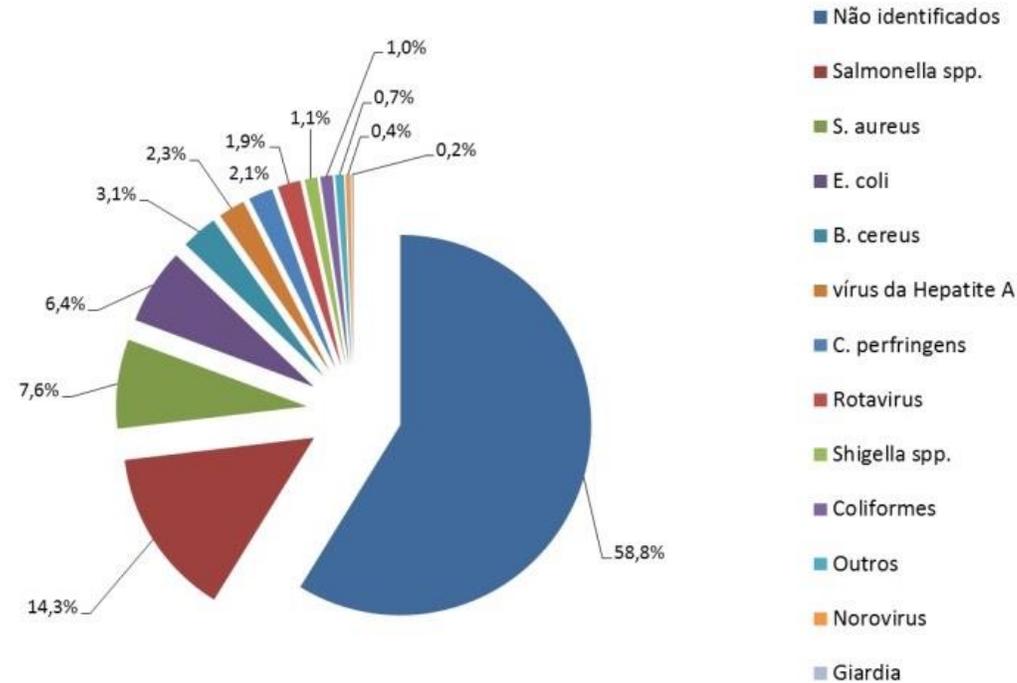
Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde
*Dados sujeitos a alteração. Última atualização em Outubro de 2015.

Surto de DTA no Brasil de acordo com o tipo de alimento contaminado



Agentes etiológicos dos surtos de DTA no Brasil

Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA.
Brasil, 2000 a 2015*.



Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde

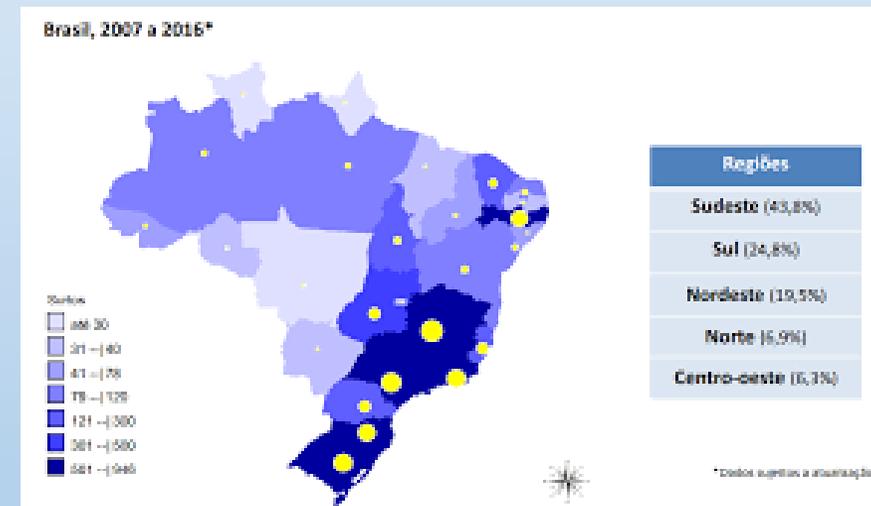
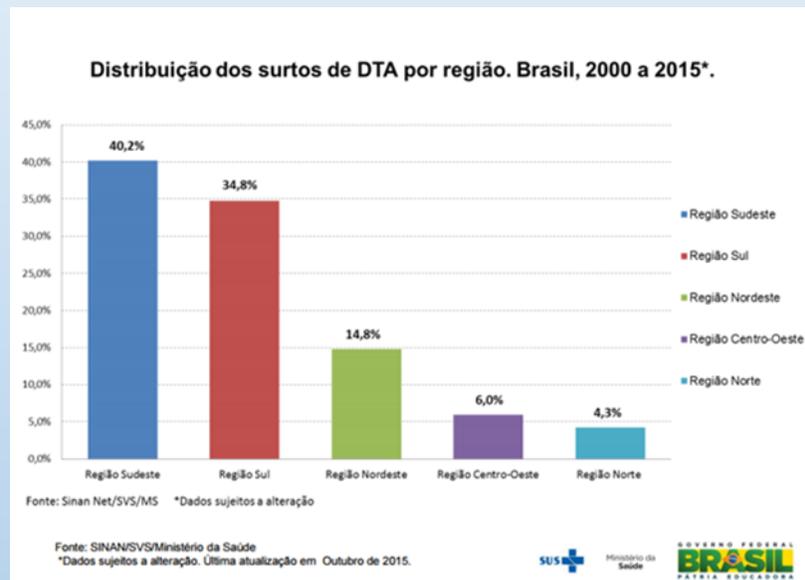
*Dados sujeitos a alteração. Última atualização em Janeiro de 2016.



Ministério da
Saúde

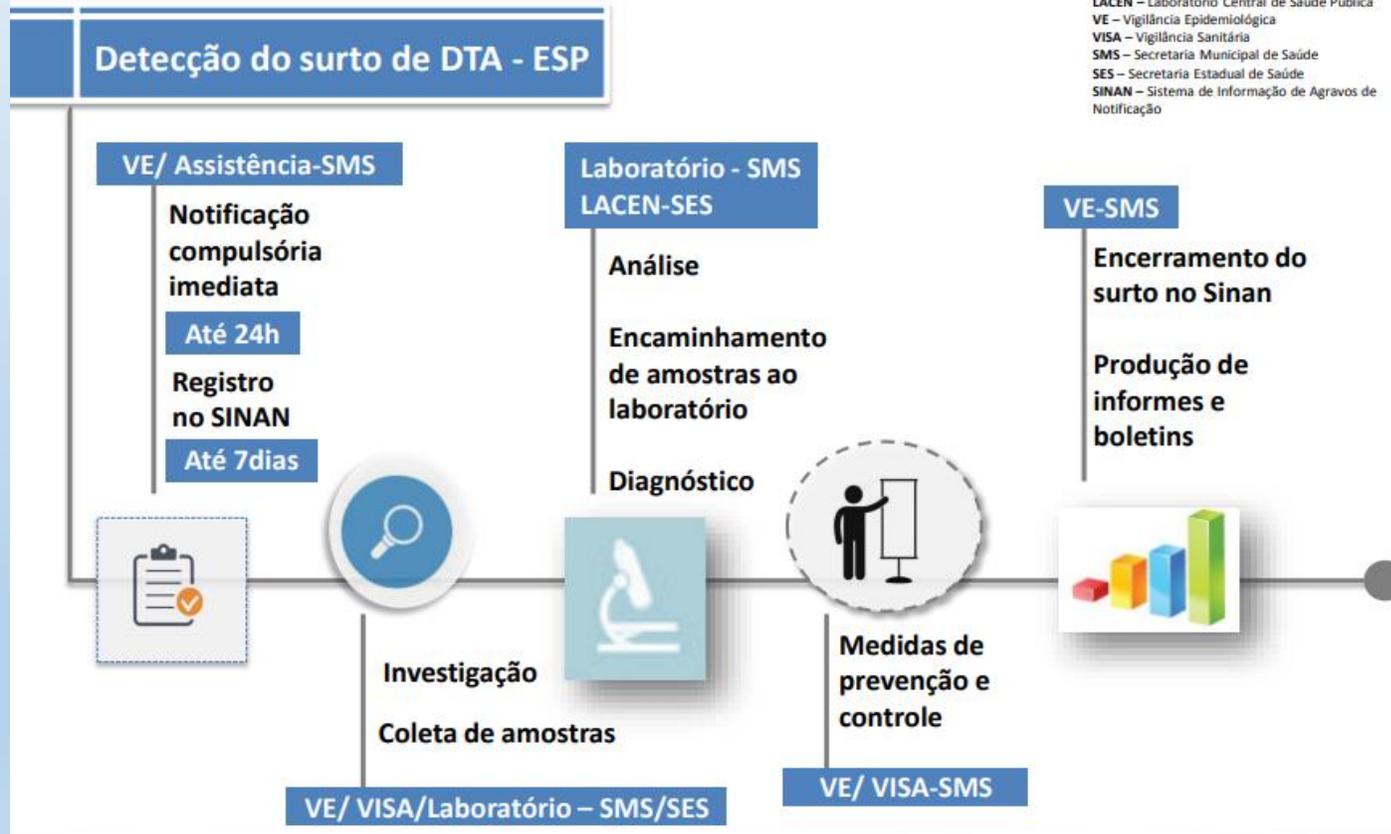


Surto de DTA por região do Brasil



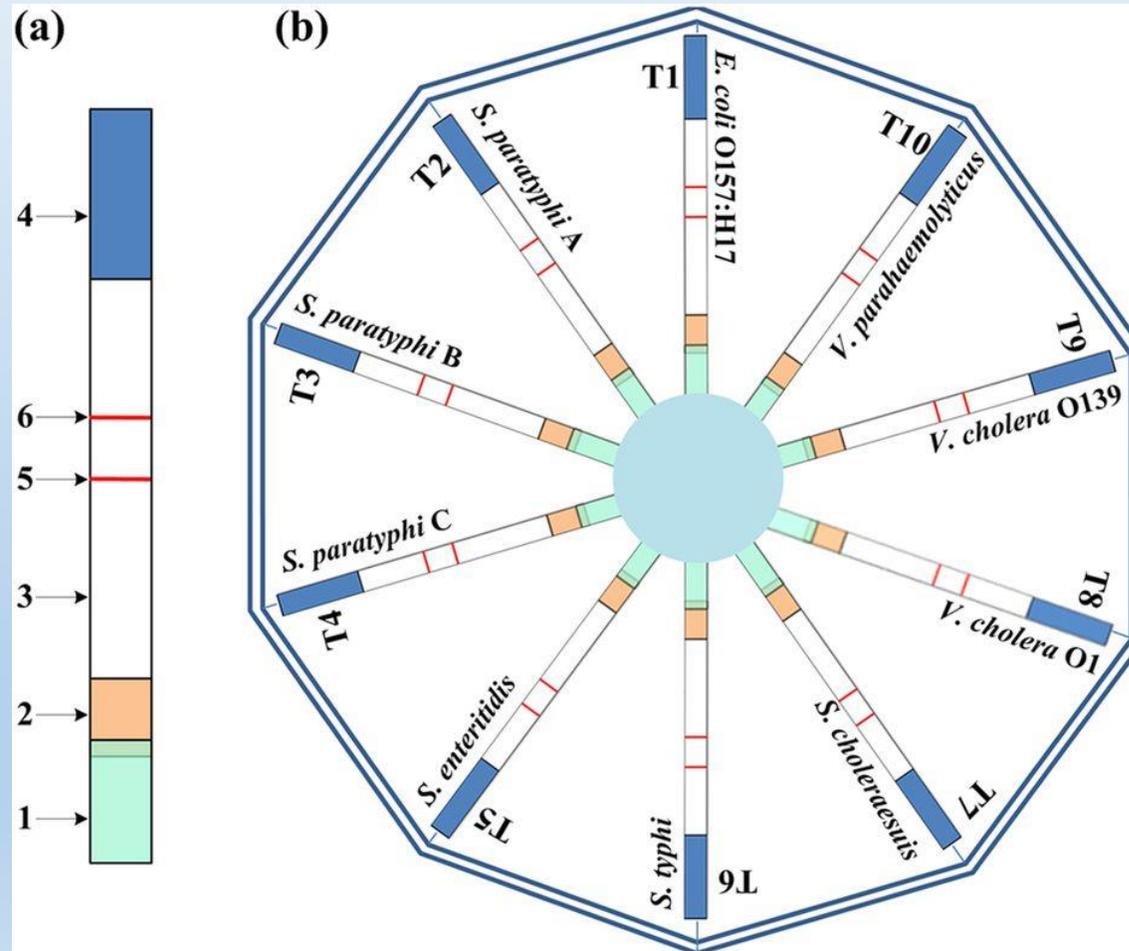
Investigação de surtos de DTA

Investigação

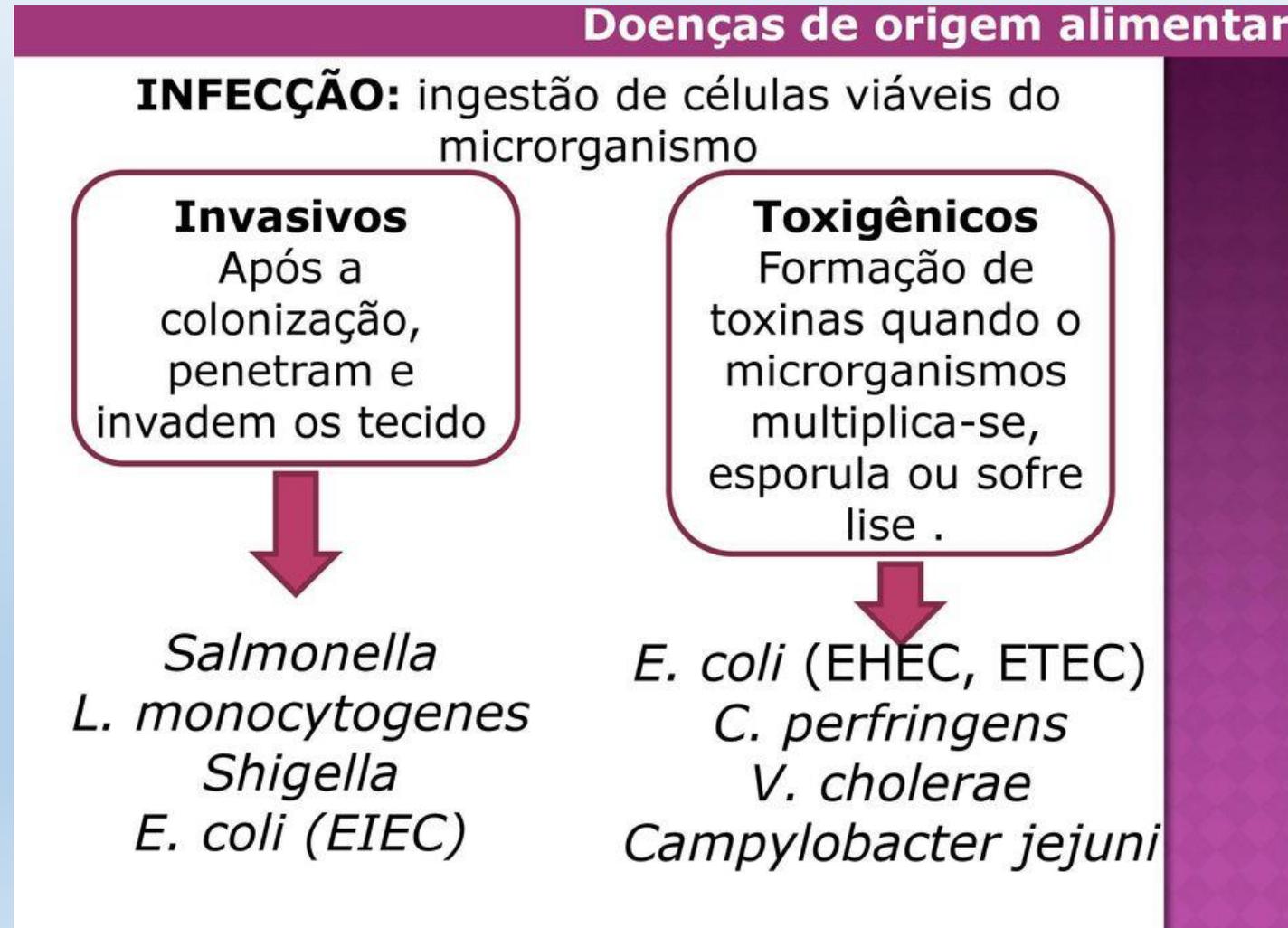


D- Doença
T- Transmitida
A- Alimentos

Patógenos entéricos que contaminam alimentos



Microrganismos invasivos e toxigênicos



Intoxicação alimentar e diarreias

Intoxicação alimentar

✓ Doenças causadas por toxinas produzidas por bactérias contaminantes presentes no alimento antes do consumo

✓ *S. aureus*, *B. cereus*, *C. botulinum*

Toxinas resistentes ao calor e a ação de enzimas digestivas

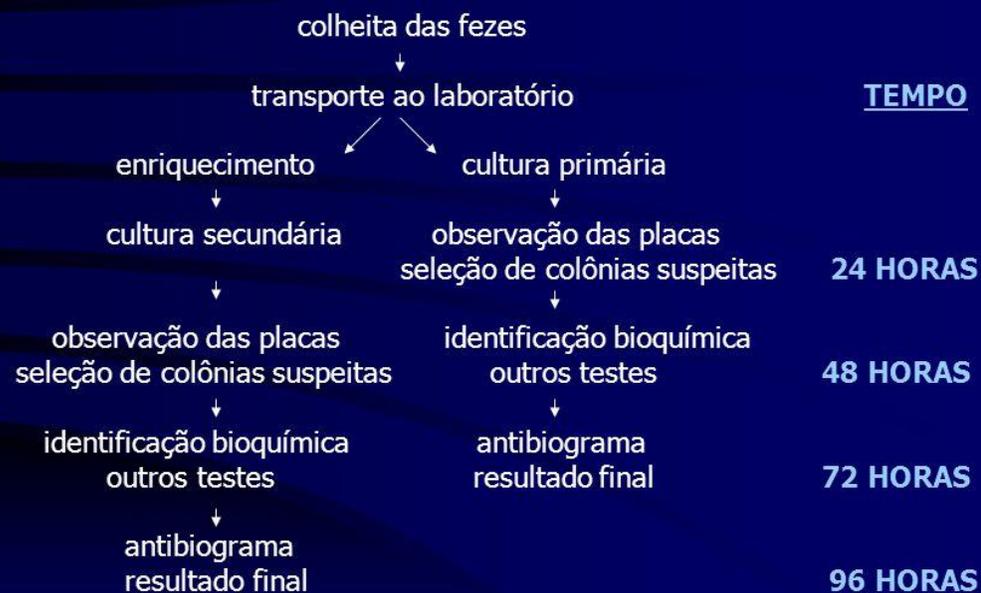
Toxinas resistentes ação de enzimas digestivas, porém podem ser inativadas após 30 min a 80°C

Botulismo infantil e de feridas: os microrganismos são ingeridos ou fixados na ferida, multiplicam-se e produzem a toxina *in vivo*

Agente etiológico	Início dos sintomas	Dados clínicos mais comuns	Diagnóstico
<i>Clostridium botulinum</i>	2 h a 8 d média: 12-48h	Distúrbios visuais, fraqueza progressiva, com paralisia descendente e bilateral. Sem diarreia.	Pesquisa de toxina no soro, fezes, coprocultura.
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 min. a 8 h média: 2-4 h	Vômitos e diarreia. Comum em surtos de toxi-infecção alimentar.	Coprocultura em meio seletivo (Baird-Parker, Vogel-Johnson ou Ágar manitol sal) e demonstração de toxina.
<i>Bacillus cereus</i> - toxina causando vômito	1-6 h	Vômitos, diarreia ocasional; Comum em surtos de toxi-infecção alimentar.	Isolamento nas fezes ou no alimento: 10 ⁵ UFC/g. Meio seletivo para <i>Bacillus cereus</i> .
<i>Bacillus cereus</i> - toxina	6-24 h	Diarreia e dor abdominal.	Idem.

Testes para identificação dos agentes etiológicos de diarreias

Roteiro esquemático da coprocultura:



Meio de cultura	Finalidade do meio	Aspectos das colônias suspeitas	Procedimento de identificação
MC (MacConkey)	Isolamento de enterobactérias	Lactose negativa (transparente ou sem cor) suspeita de <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> e <i>E. coli</i> invasivas Lactose positiva (cor-de-rosa) suspeita de <i>E. coli</i>	Rugai ou EPM-MILI e sorotipagem
Bem (eosin Methylene blue)	Isolamento de enterobactérias	Transparente ou roxo-claro – suspeita de <i>Salmonella spp.</i> Roxo-escuro com brilho metálico – suspeita de <i>E. coli</i>	Rugai ou EPM-MILI e sorotipagem
HE (ágar Hektoen Enteric)	Seletivo para <i>Salmonella</i> e <i>Shigella</i> Contém indicador da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	Azul ou verde-azulado- suspeita de <i>Salmonella spp.</i> (com ou sem centro negro), <i>Shigella spp.</i> Amarela – suspeita de <i>E. coli</i>	Rugai ou EPM-MILI e sorotipagem
SS (<i>Salmonella</i> – <i>Shigella</i>)	Seletivo para <i>Salmonella spp.</i> Pode inibir <i>Shigella spp.</i> Contém indicador da produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	Incolor (com ou sem o centro negro) – suspeita de <i>Salmonella spp.</i> Incolor – suspeita de <i>Shigella spp.</i> Colônias negras – suspeita de <i>Salmonella spp.</i> Colônias cor-de-rosa – suspeita de <i>E. coli</i>	Rugai ou EPM-MILI e sorotipagem
VB (verde-brilhante)	Seletivo para <i>Salmonella spp.</i>	Vermelha, rosa forte ou translúcida circundadas de vermelho – suspeita de <i>Salmonella spp.</i> Amarela – suspeita de <i>Klebsiella spp.</i>	Rugai ou EPM-MILI e sorotipagem
AS Campy ou Karmali	Seletivo para <i>Campylobacter</i>	Acinzentada, brilhante e irregular suspeita de <i>Campylobacter</i>	Identificação bioquímica Coloração com fucsina de Ziehl ou safranina (1m)

Microbiologia em Alimentos: detecção de bactérias

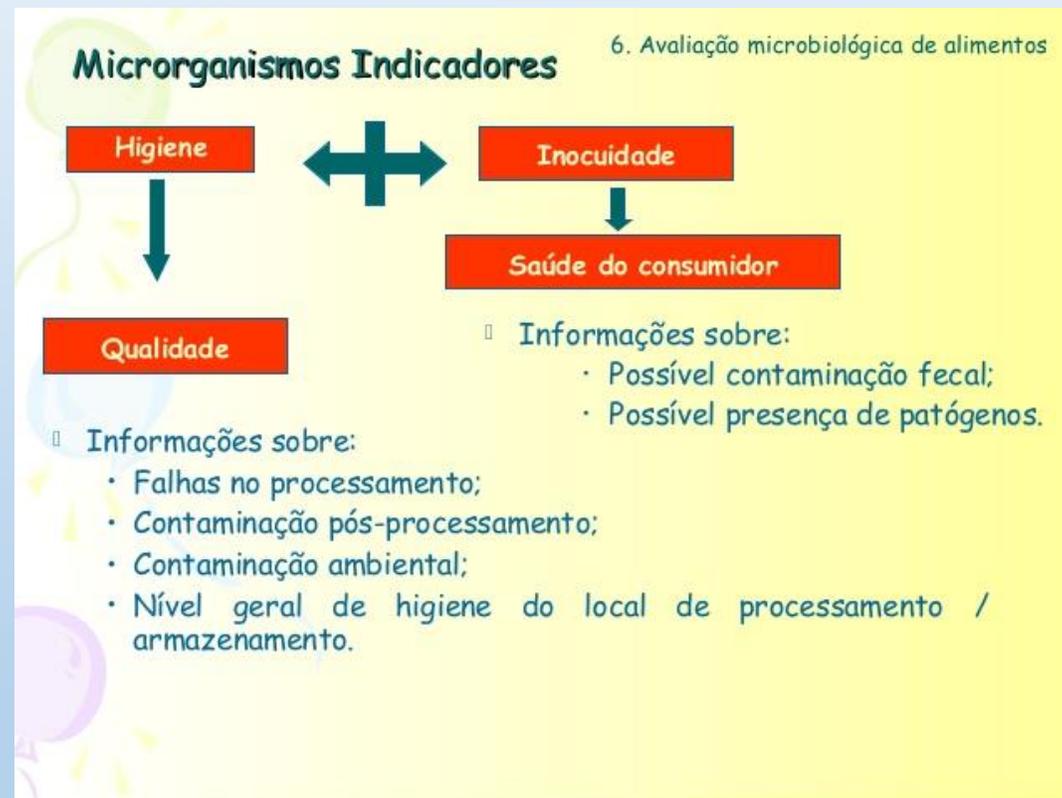
- Grupo *Bacillus cereus* e suas toxinas
- *Campylobacter* spp.
- *Clostridium perfringens*
- *Cronobacter sakazakii*
- *Escherichia coli* (STEC) produtora de toxina shiga, como: *E. coli* O157/H7 e *E. coli* O104/H4
- Detecção de outras espécies de *E. coli* (exigência do Serviço de Inspeção de Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos EUA):
 - *E. coli* O26
 - *E. coli* O45
 - *E. coli* O103
 - *E. coli* O111
 - *E. coli* O121
 - *E. coli* O145
- *Legionella pneumophila*
- *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*
- *Salmonella* spp. e serotipos de *Salmonella* (*S. typhimurium* e *S. enteritidis*)
- *Shigella* spp.
- *Staphylococcus aureus*
- Toxina de *Staphylococcus aureus*
- *Vibrio* spp. (*Vibrium colerae* após inundações)
- *Yersinia enterocolitica*
- Norovírus
- HAV

Testes de Microbiologia em Alimentos

- A análise microbiológica de alimentos realizada para detectar agentes patogênicos e organismos deteriorantes em alimentos pode assegurar a segurança contínua de seus produtos alimentícios ao longo da cadeia de suprimento
- Os microrganismos funcionais também devem ser monitorados durante a produção até o produto final
- As análises microbianas avaliam a segurança dos ingredientes de alimentos semi-processados, dos seus produtos finais e dos processos propriamente ditos
- Teste de agentes patogênicos em alimentos
- Testes de agentes patogênicos em alimentos funcionais
- Testes microbiológicos rápidos em alimentos
- Testes de higiene alimentar

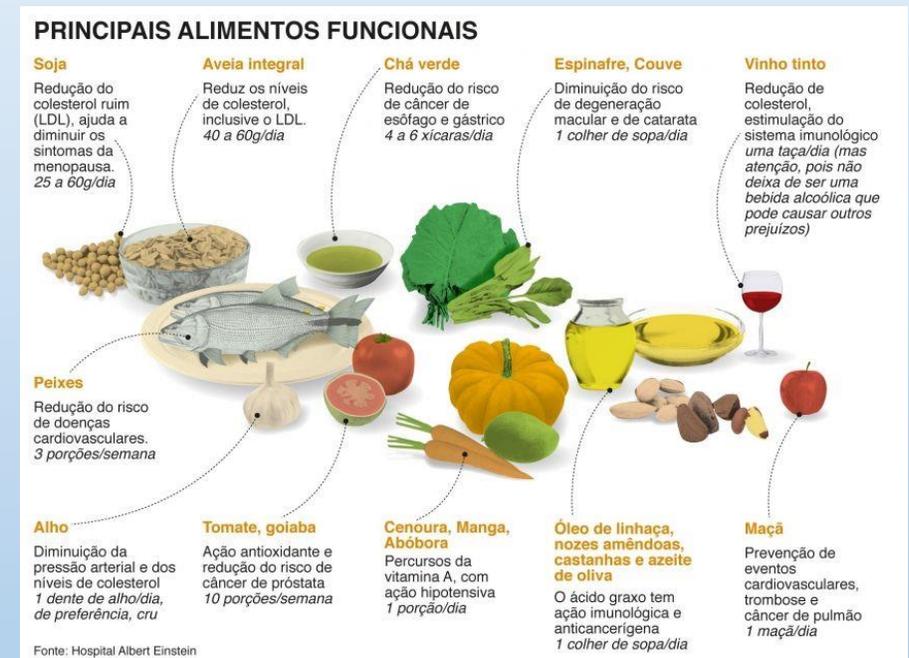
Testes de higiene alimentar

- O teste de espécies indicadoras é uma maneira inteligente de avaliar as condições sanitárias, de forma a oferecer um aviso precoce de problemas de contaminação e destacar a necessidade de outros testes de diagnóstico
- São testados os seguintes indicadores comuns: contagem total de aeróbios, leveduras e mofo, clostrídios sulfito-redutores, coliformes fecais, enterobactérias, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*
- Também são testados agentes patogênicos ambientais: *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.



Testes de alimentos funcionais

- Alimento funcional é todo aquele que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, quando consumidos usualmente e acompanhados por hábitos saudáveis
- Fabricantes e importadores de alimentos devem assegurar que todos os benefícios alegados, como "natural", "saudável" e "probiótico", entre outros, são precisos. Os testes de alimentos e produtos dão suporte à demonstração de conformidade com base em evidências científicas.
- Os benefícios alegados à saúde são usados em embalagens e rótulos para informar os consumidores sobre a qualidade dietética e a relação dieta-doença. Os testes e análises de produtos verificarão se a concentração de ingredientes alegada, frequentemente associada a produtos saudáveis e bebidas energéticas, é verdadeira e cientificamente comprovada.



Testes de alimentos funcionais

- Laboratórios acreditados pela ISO 17025 realizam testes usando tecnologias que incluem cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia em fase gasosa (GC), ambos com detectores diferentes, como espectrometria de massa (MS e MS/MS) e análise tradicional de nutrientes

Parâmetros avaliados

- Polifenóis totais, Procianidinas totais, Bioflavonóides totais, Carotenóides, Ácidos fenólicos, Catequinas, Ácidos orgânicos, Flavonóides, Isoflavonas, Nucleosídeos e nucleotídeos, Esteróis, Aminoácidos, Ácidos graxos, incluindo ácidos graxos ômega, Vitaminas, Painel nutricional pré-estabelecido de acordo com o tipo de produto analisado e presença de Lactobactérias



Segurança alimentar

- O termo “segurança alimentar” começou a ser utilizado após o fim da primeira guerra mundial. Com a traumática experiência da guerra, vivenciada sobretudo na Europa, tornou-se claro que um país poderia dominar o outro controlando seu fornecimento de alimentos
- Definição: conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos visando determinadas características físicas e químicas, além de microbiológicas e sensoriais padronizadas, segundo as quais os alimentos seriam adequados ao consumo
- Refere-se a alimento seguro ou alimento adequado ao consumo. Estas regras são internacionais, de modo que as relações entre os povos possam atender as necessidades comerciais e sanitárias. Esta é a razão de "barreiras sanitárias" por alguns países com relação a matérias-primas agropecuárias e produtos alimentícios importados



Testes microbiológicos rápidos em alimentos

- Agentes patogênicos em alimentos que chegam ao consumidor podem causar doenças e até morte. Produtos contaminados que alcançam a cadeia alimentar, mesmo que descobertos antes de causarem danos, podem prejudicar irremediavelmente uma marca e seu fabricante. No mínimo, a disponibilização de produtos alimentícios contaminados resultará em caros recalls e destruições de produtos.
- Os testes microbiológicos rápidos em alimentos oferecem resultados mais rápidos que os tradicionais e verificam a presença ou a ausência de agentes patogênicos, ajudando as empresas a assegurar que os produtos contaminados não sejam disponibilizados na cadeia de suprimento.

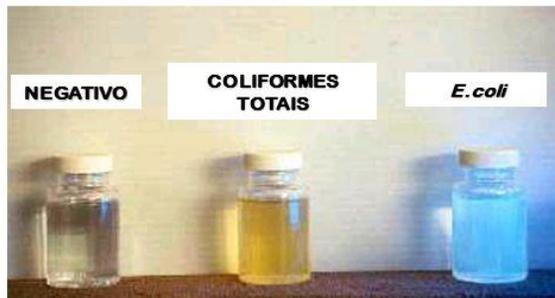


Testes rápidos colorimétricos



Testes colorimétricos (substrato cromogênico)

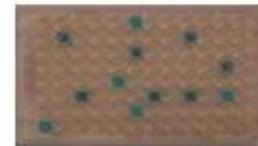
TESTE COM SUBSTRATO CROMOGENICO



4 positive wells for coliforms
MPN 11



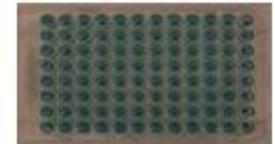
3 positive wells for E.coli MPN 8



12 positive wells for coliforms MPN
33



7 positive wells for E.coli MPN 19



96 positive wells for coliforms MPN
is greater than 2424



96 positive wells for E.coli MPN is
greater than 2424

Testes bioquímicos

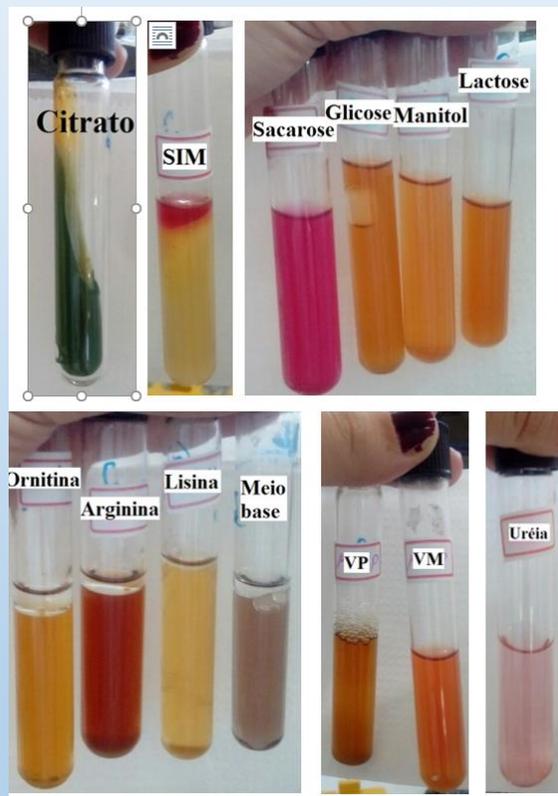
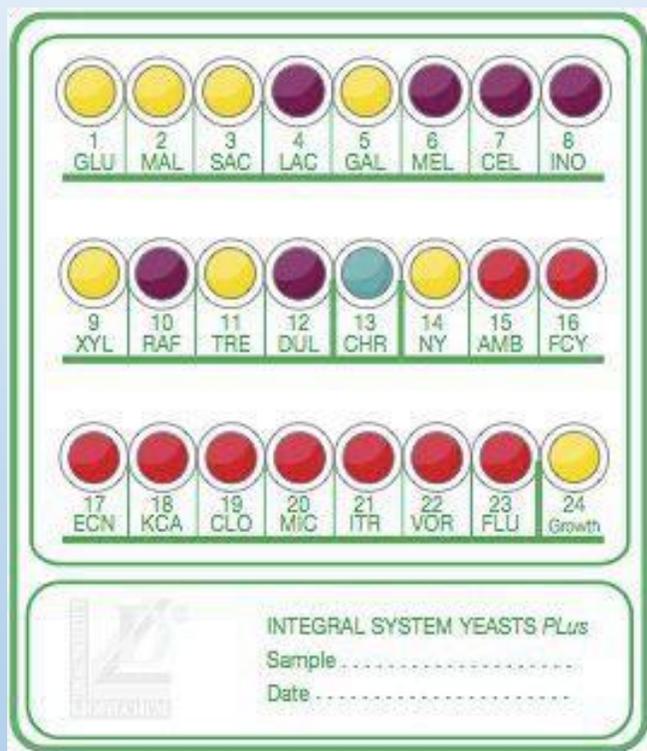


TABELA 2. Comportamento de cepas identificadas de *Staphylococcus* spp, isoladas de alimentos *in natura* e processados, com relação aos testes bioquímicos.

Testes Bioquímicos	Número Total	Espécies de <i>Staphylococcus</i>			
		<i>aureus</i> *	<i>aureus</i> **	<i>intermedius</i>	SCP
	15	1	8	2	4
		Reações positivas			
Coagulase	15	1	8	2	4
Termonuclease	06	1	2	2	1
Catalase	15	1	8	2	4
Acetoina	11	1	8	0	2
Manitol	08	1	3	2	2
Maltose	09	1	6	1	1
Glicose A	09	1	6	1	1
Glicose An	09	-	6	1	2
DNase	13	1	7	2	3
Crescimento em NaCl 7,5%	13	1	7	2	3

*S. aureus - com identificação confirmativa;
 **S. aureus - somente com identificação presuntiva;
 SCP - estafilococos coagulase positiva;
 Glicose A - glicose em aerobiose;
 Glicose An - glicose em anaerobiose.

Testes bioquímicos

Composição de meios de cultura comumente utilizados

TSI (Triple Sugar Iron)

- Fermentadores e não-fermentadores de glicose, lactose e sacarose, produção de gás e de H_2S
- Fermentadores: acidificação = amarelo
- Sais de ferro e tiosulfato: H_2S + tiosulfato: sulfato ferroso: precipitado negro.

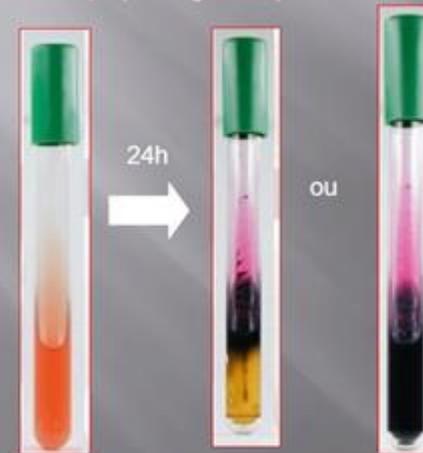


TSI

Bioquimismo - *Salmonella* spp.

Teste TSI:

TSI (Triple sugar iron):



- Lactose (1%);
 - Sacarose (1%);
 - Glicose (01%);
- Carboidratos

- Vermelho de fenol;
- Indicador de pH

- Tiosulfato de sódio;
 - Sulfato ferroso;
- Indicador de H_2S

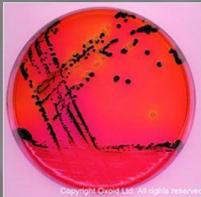
- Cloreto de sódio;
 - Extrato de carne;
 - Extrato de levedura;
 - Peptona
- Nutrientes

Testes metabólicos para diferenciar bactérias

Testes de Metabolismo

Diferenciação de *Salmonella* e *Shigella*

Ágar XLD – **Xilose, lisina e deoxicolato (ácido biliar)**. Meio seletivo usado para isolamento de *Salmonella* e *Shigella* a partir de amostras clínicas e alimentos. Contém phenol red como indicador de pH (ácido – amarelo; alcalino – rosa a vermelho). *Salmonella* metaboliza o tiosulfato produzindo H₂S que reage com o ferro produzindo um composto escuro (centro da colônia negro).

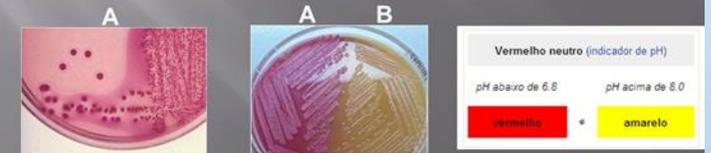


Testes de Metabolismo

Enterobacteriaceae (Gram –)

- A- *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* fermentam lactose produzindo ácido e gás
- B- *Shigella* e *Salmonella* não utilizam lactose em seu metabolismo. Degradam a peptona formando amônia.

Ágar MacConkey - contém **bile** que inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram +, **crystal violeta** (Inibe algumas bactérias Gram +) e **vermelho neutro** (indicador de pH), lactose e peptona.

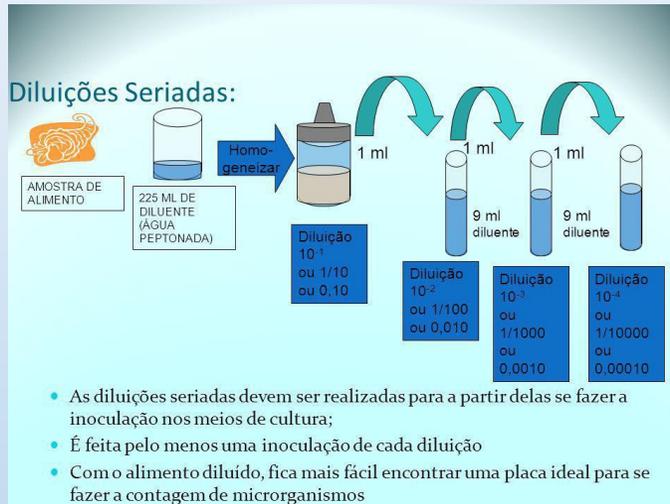


Testes de Metabolismo

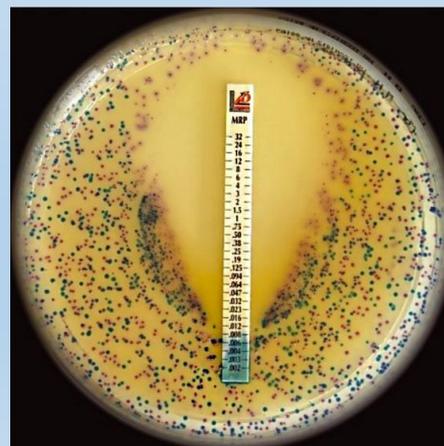
Catalase

- É uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (3%) em oxigênio e água;
- Indispensável na identificação de cocos Gram positivos;
- Estafilococos são catalase positivos;
- Streptococos são catalase negativos;
- Exceto os estreptococos, a maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias decompõe o peróxido de hidrogênio

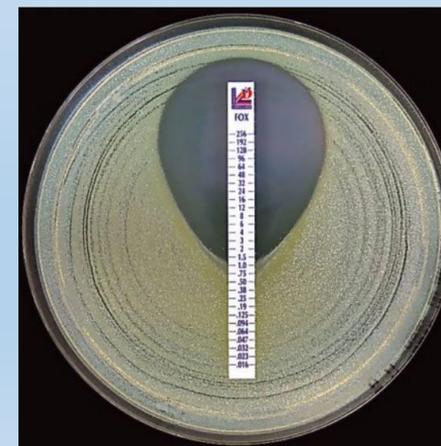
Testes de sensibilidade a antimicrobianos



Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos



Mixed culture on Chromatic MH
MIC Test Strip Meropenem 0.002 - 32 µg/mL



Staphylococcus aureus ATCC® 29213
MIC Test Strip Cefoxitin 0.016 - 256 µg/mL
M.I.C. = 1.5 µg/mL

Teste de formação de biofilme

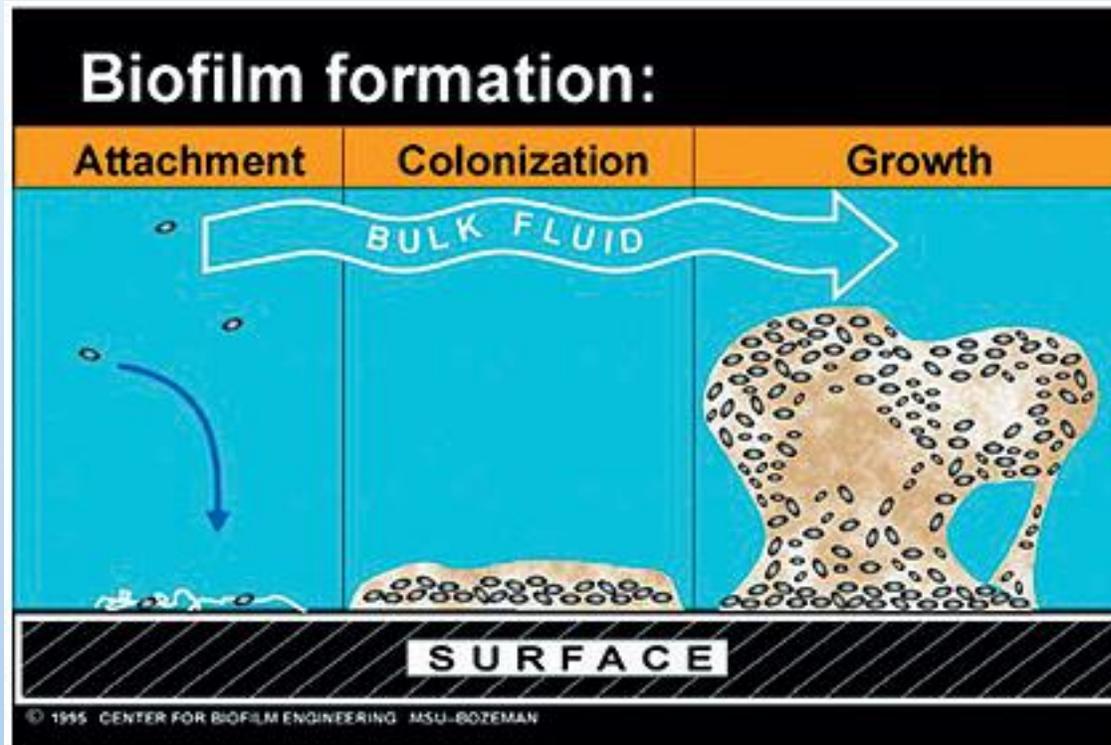
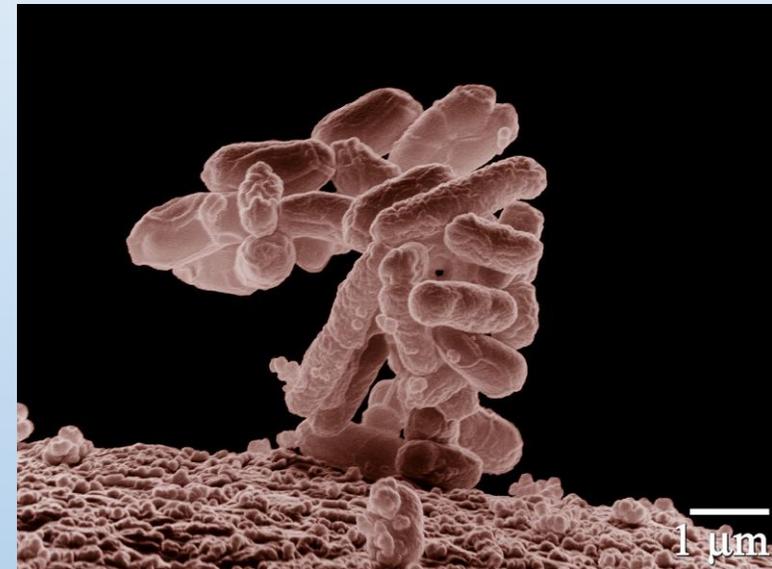
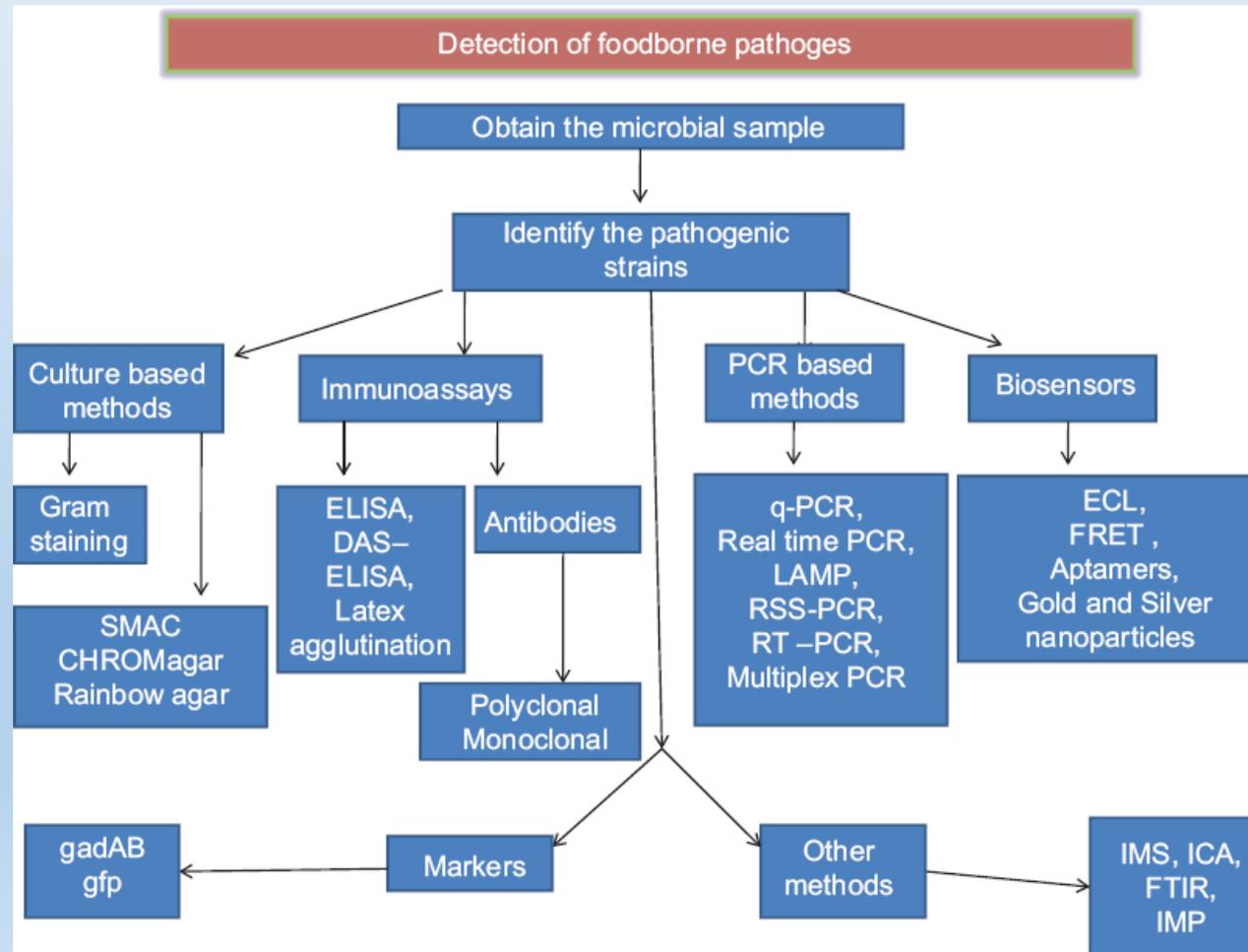


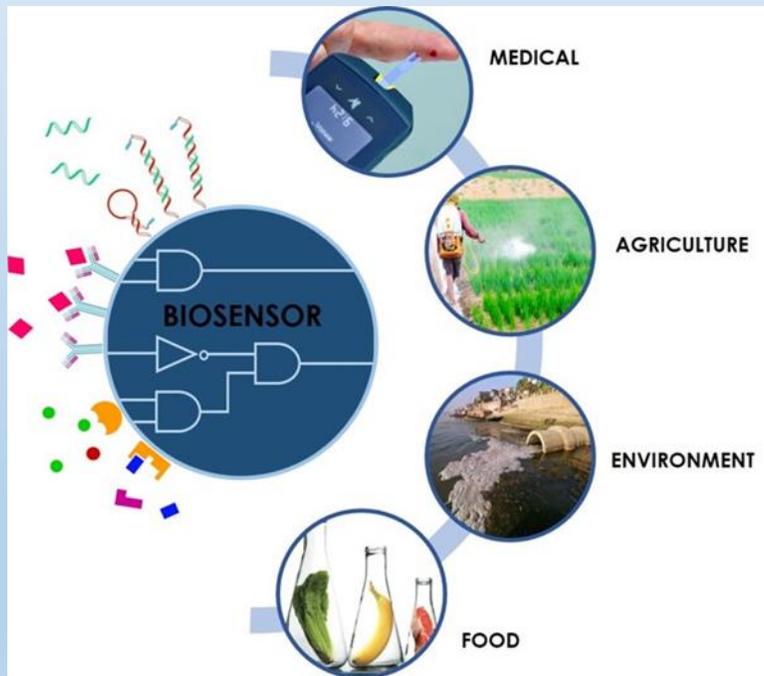
Figura 1 – Esquema de formação de biofilme sobre uma superfície sólida.



Metodologia para detecção de microrganismos em alimentos



Kits para a detecção de microrganismos por Biossensores



Some Biosensors and Kits.

Table 1. Miniaturized biochemical kits and automated systems for identifying foodborne bacteria

System	Format	Manufacturer	Organisms
Cobas IDA	biochemical	Hoffmann LaRoche	Enterobacteriaceae
Micro-ID ^a	biochemical	REMEL	Enterobacteriaceae, Listeria
MIS ^a	Fatty acid ^b	Microbial-ID	Enterobacteriaceae, Listeria, Bacillus, Staphylococcus, Campylobacter
Walk / Away	biochemical ^a	MicroScan	Enterobacteriaceae, Listeria, Bacillus, Staphylococcus, Campylobacter
Riboprinter	nucleic acid ^b	Qualicon	Salmonella, Staphylococcus, Listeria, Escherichia coli
Malthus ^a	conductance ^b	Malthus	Salmonella, Listeria, Campylobacter, E. coli, Pseudomonas, coliforms
Bactometer	impedance ^c	bioMérieux	Salmonella

Exemplos de biossensores

Example of biosensors

- **Pregnancy test**

Detects the hCG protein in urine.

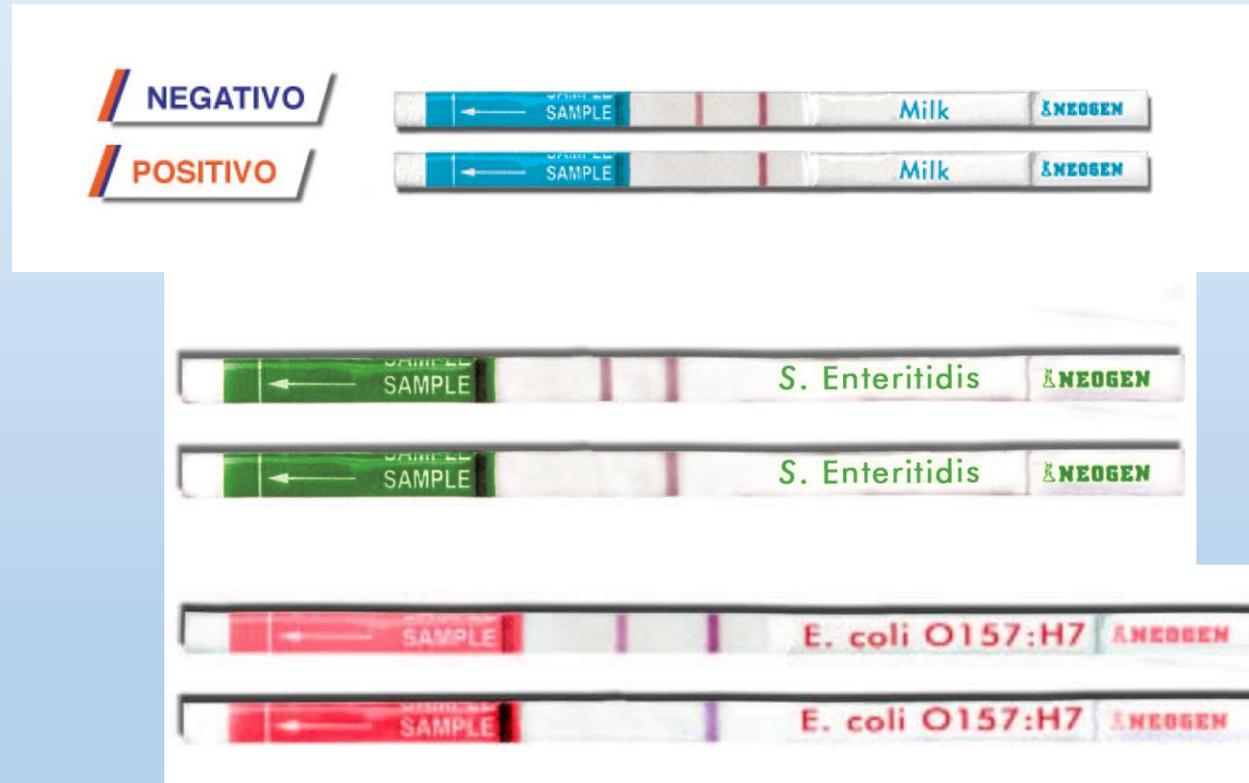
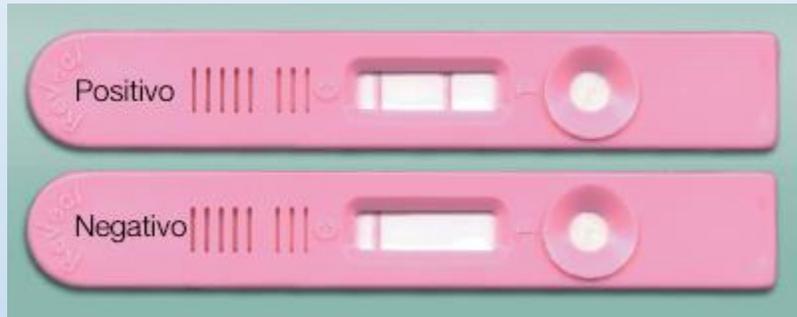


- **Glucose monitoring device (for diabetes patients)**

Monitors the glucose level in the blood.



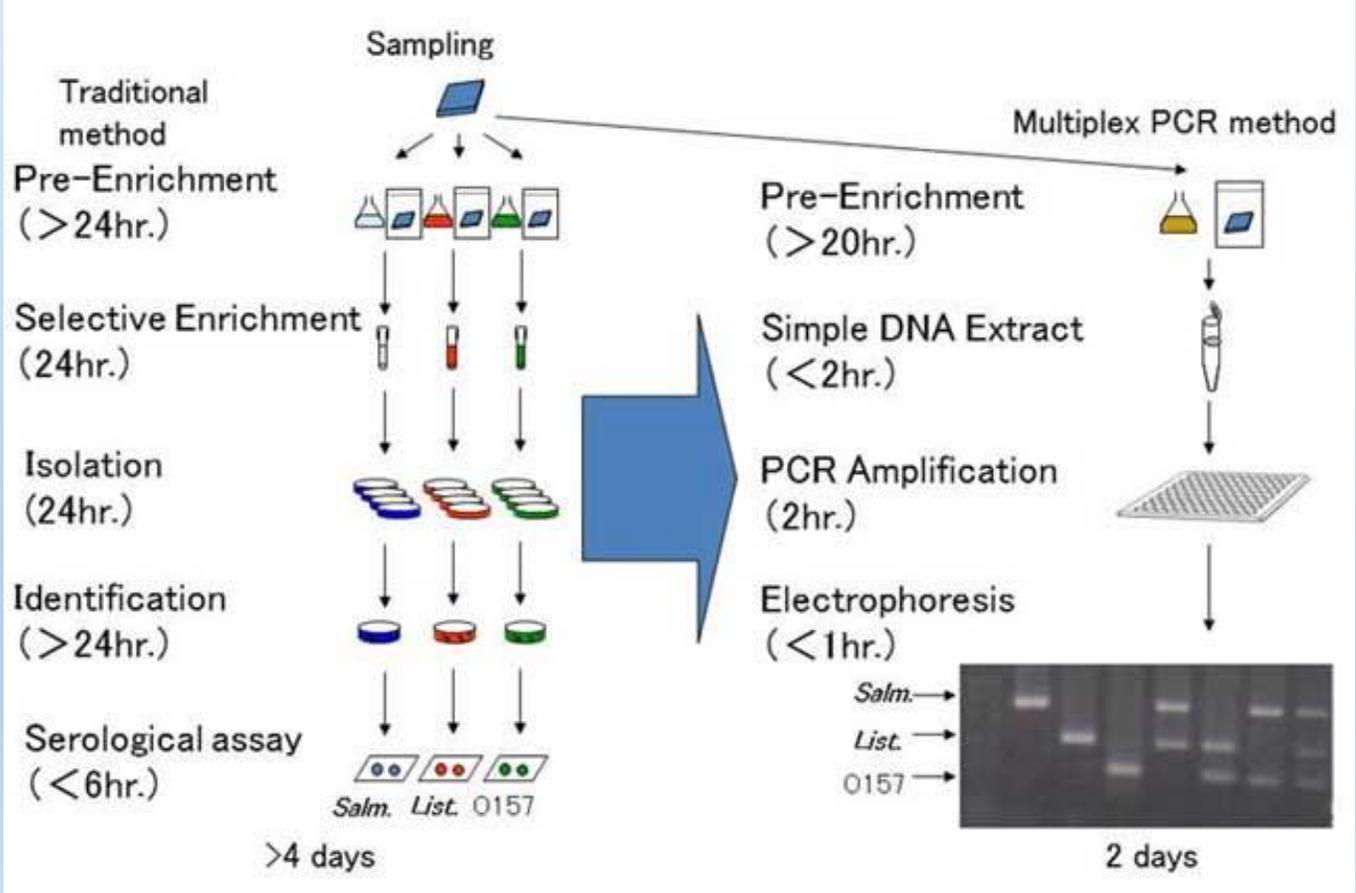
Testes rápidos: cromatografia



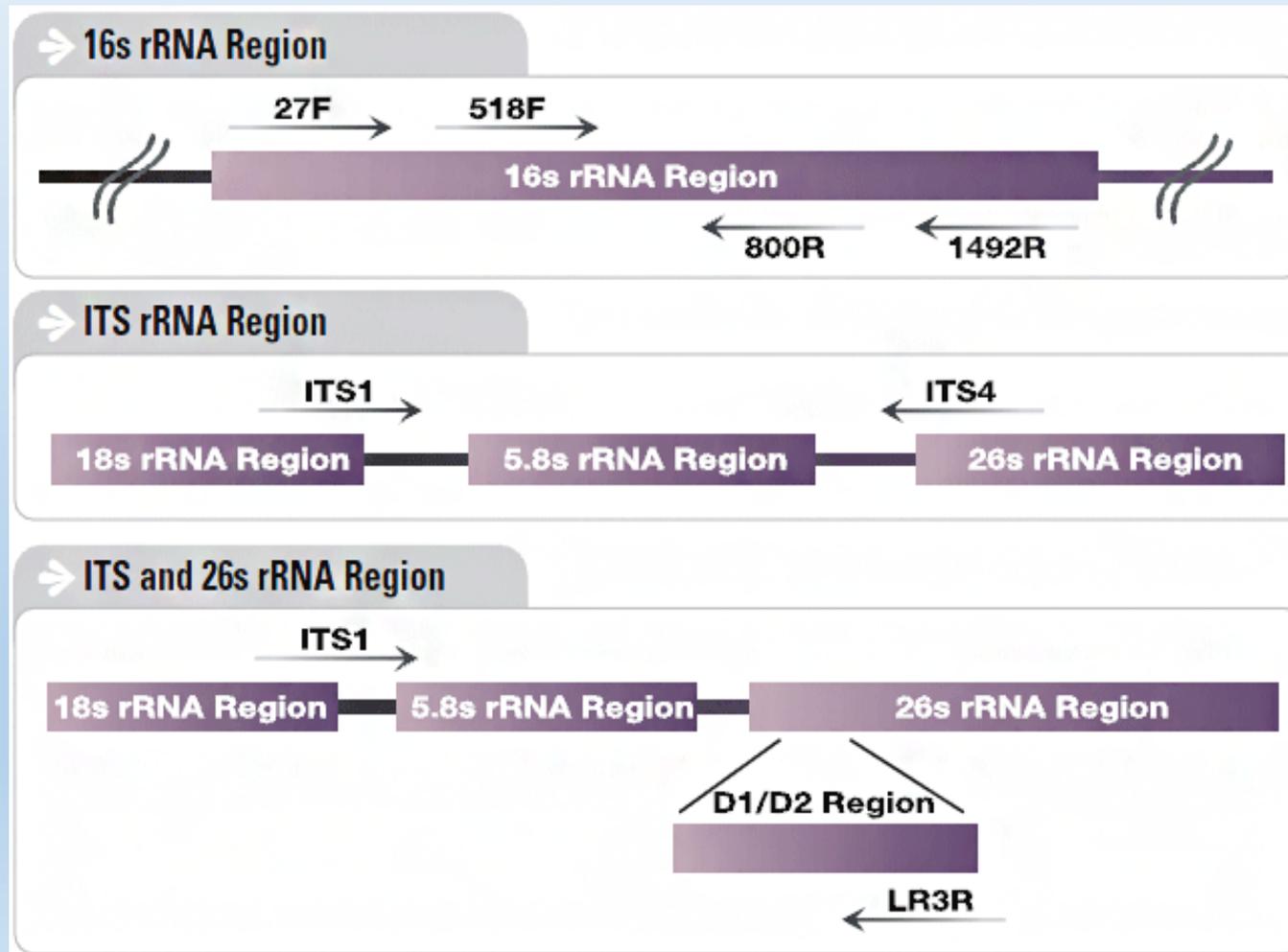
Detecção de parasitos e vírus que causam diarreias por imunocromatografia



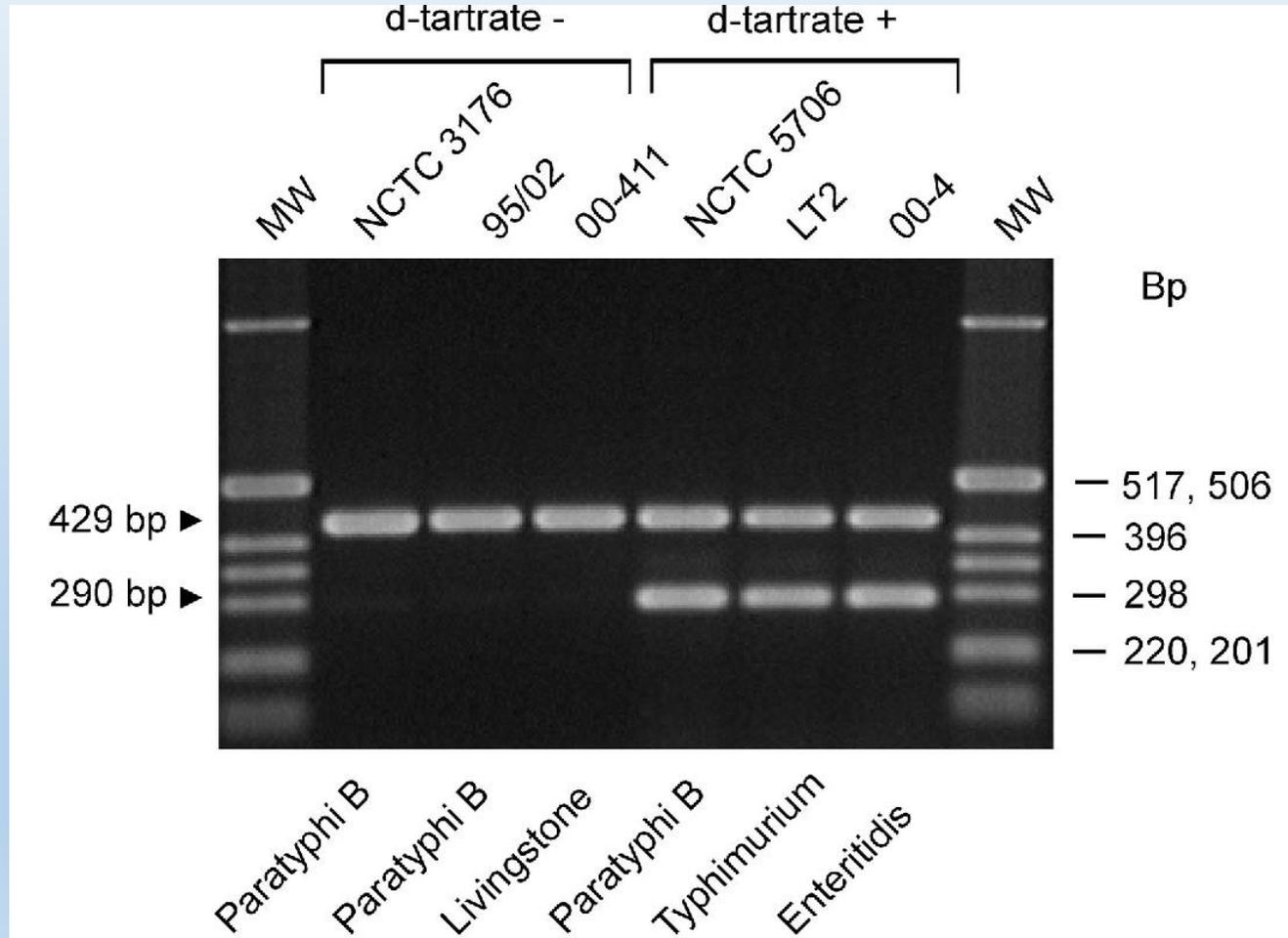
Isolamento do microrganismo em cultura, detecção de antígeno ou anticorpo (sorologia) e PCR



Sequência 16S rRNA de bactérias: um dos alvos preferenciais da PCR



Detecção molecular de *Salmonella* por PCR



PCR-based discrimination of dT⁻ and dT⁺ *Salmonella* strains. The agarose gel shows the multiplex PCR profiles from

Detecção molecular de *Shigella* por PCR

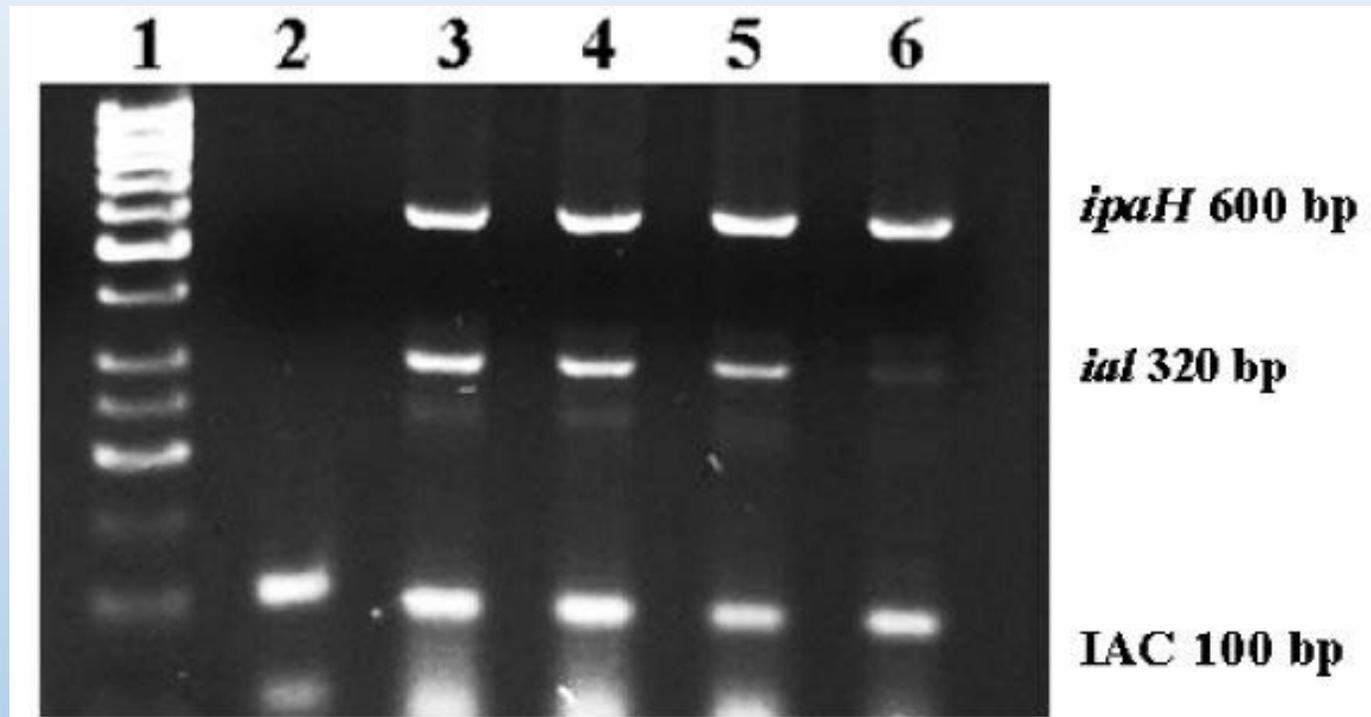
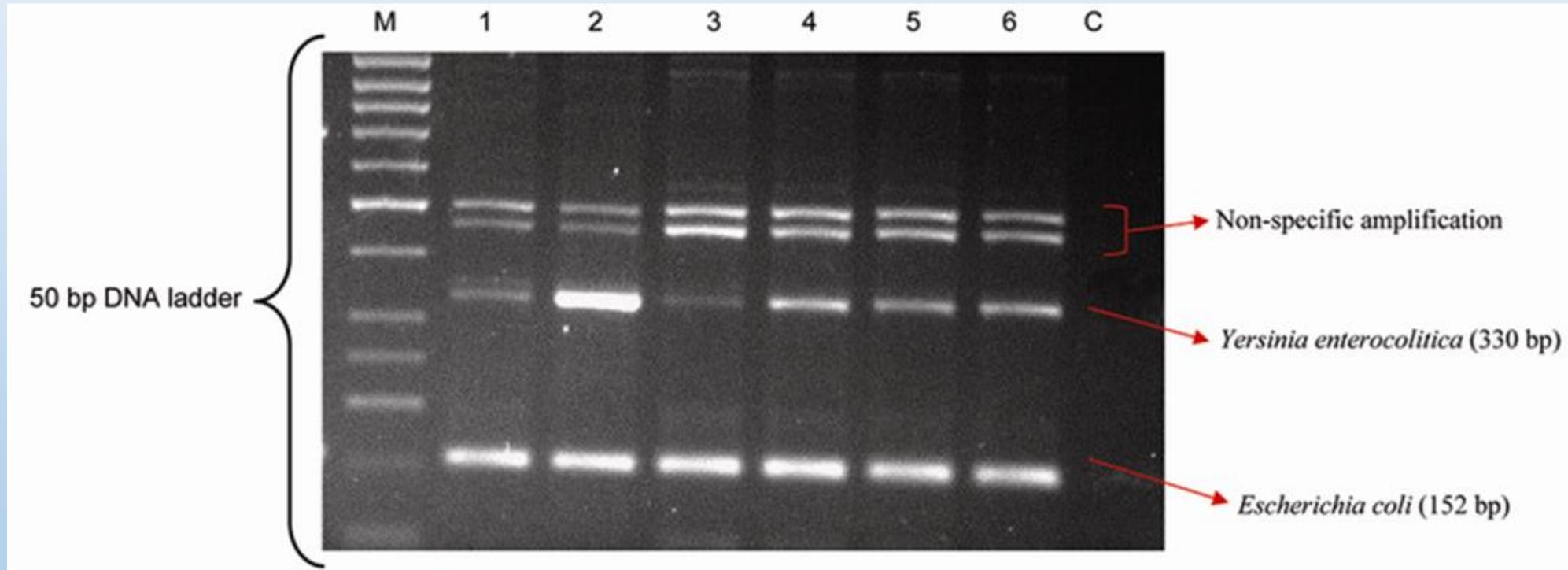


Figure 1. Multiplex PCR standardization results: 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. Lane 1: molecular size marker; lane 2: negative control, lane 3 and 4: *Shigella flexneri* strain 50 (*ipaH*+/*ial*+); lanes 5 and 6: *Shigella flexneri* strain 01 (*ipaH*+/*ial*+).

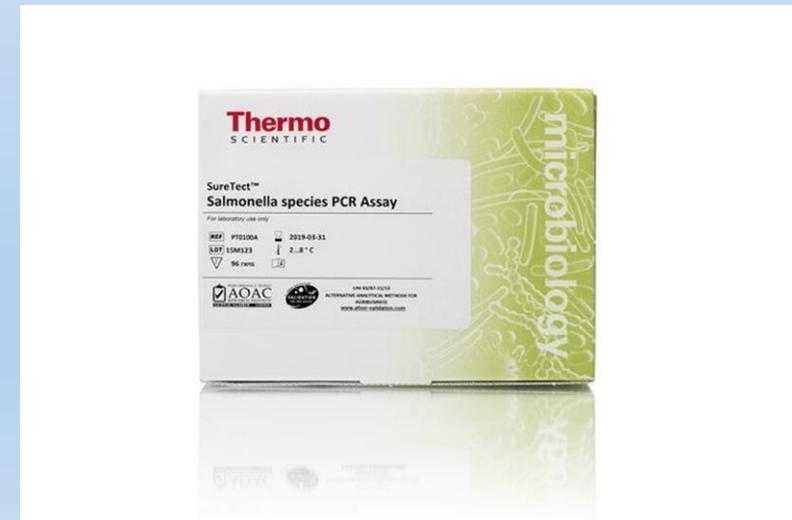
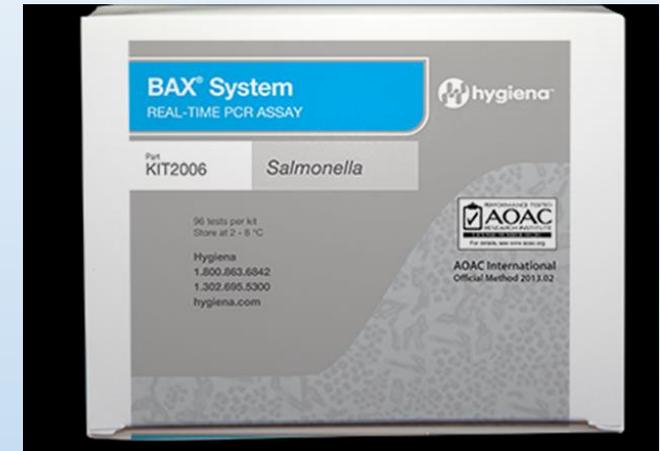
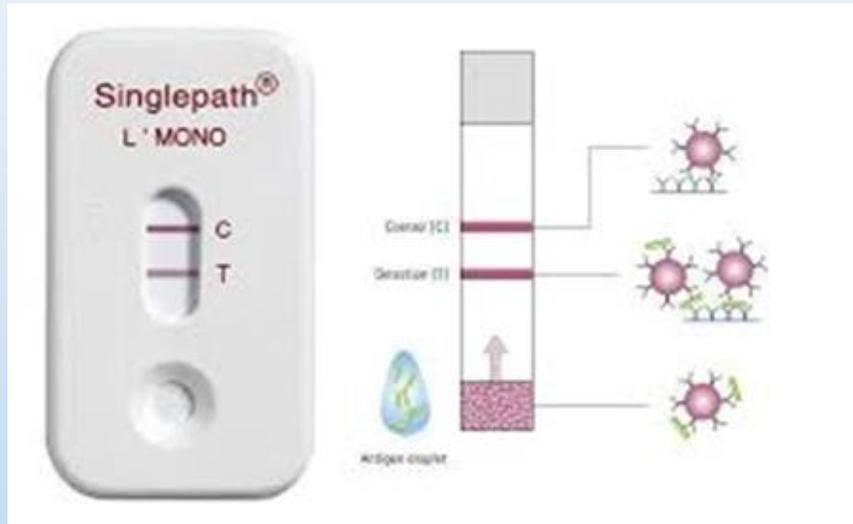
Detecção molecular de *Yersinia* por PCR



Kits comerciais para detecção de microrganismos por PCR



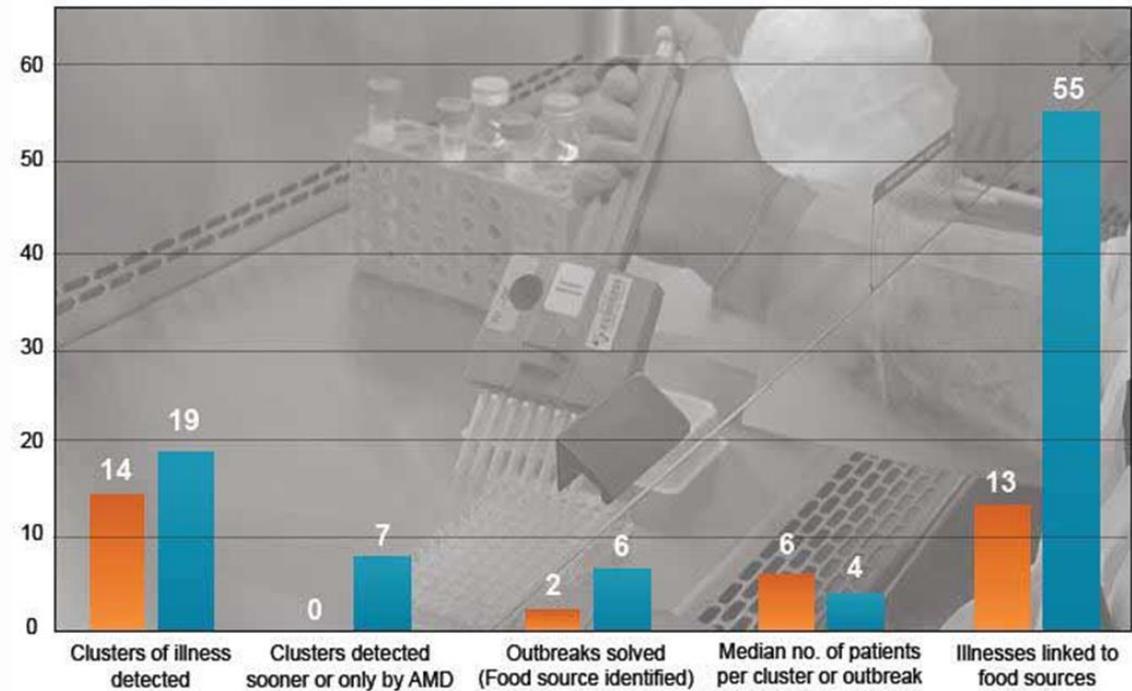
Detecção de bactérias: *Salmonella*



Detecção de *Listeria* e *Legionella* por PCR



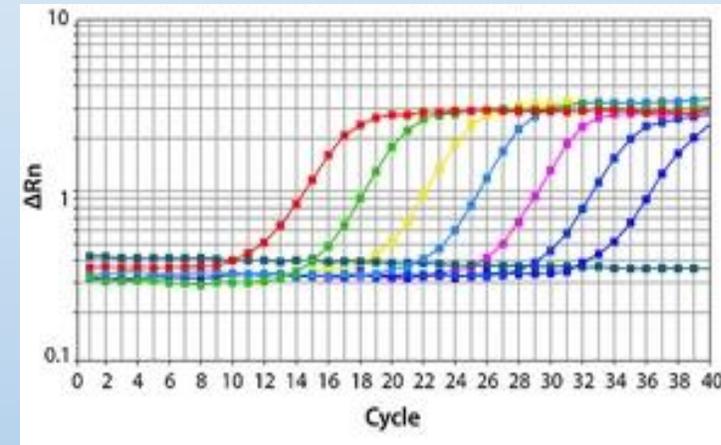
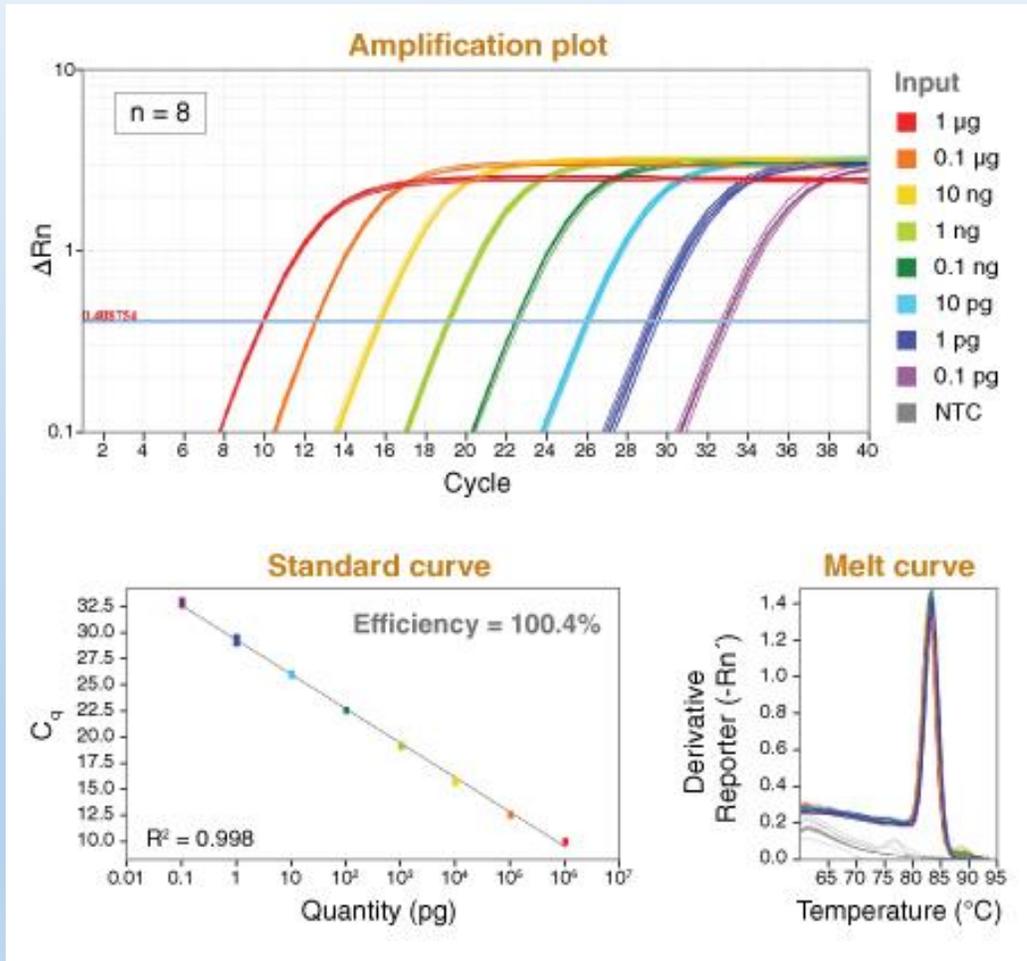
The Impact of Advanced Molecular Detection: Investigating *Listeria* Outbreaks



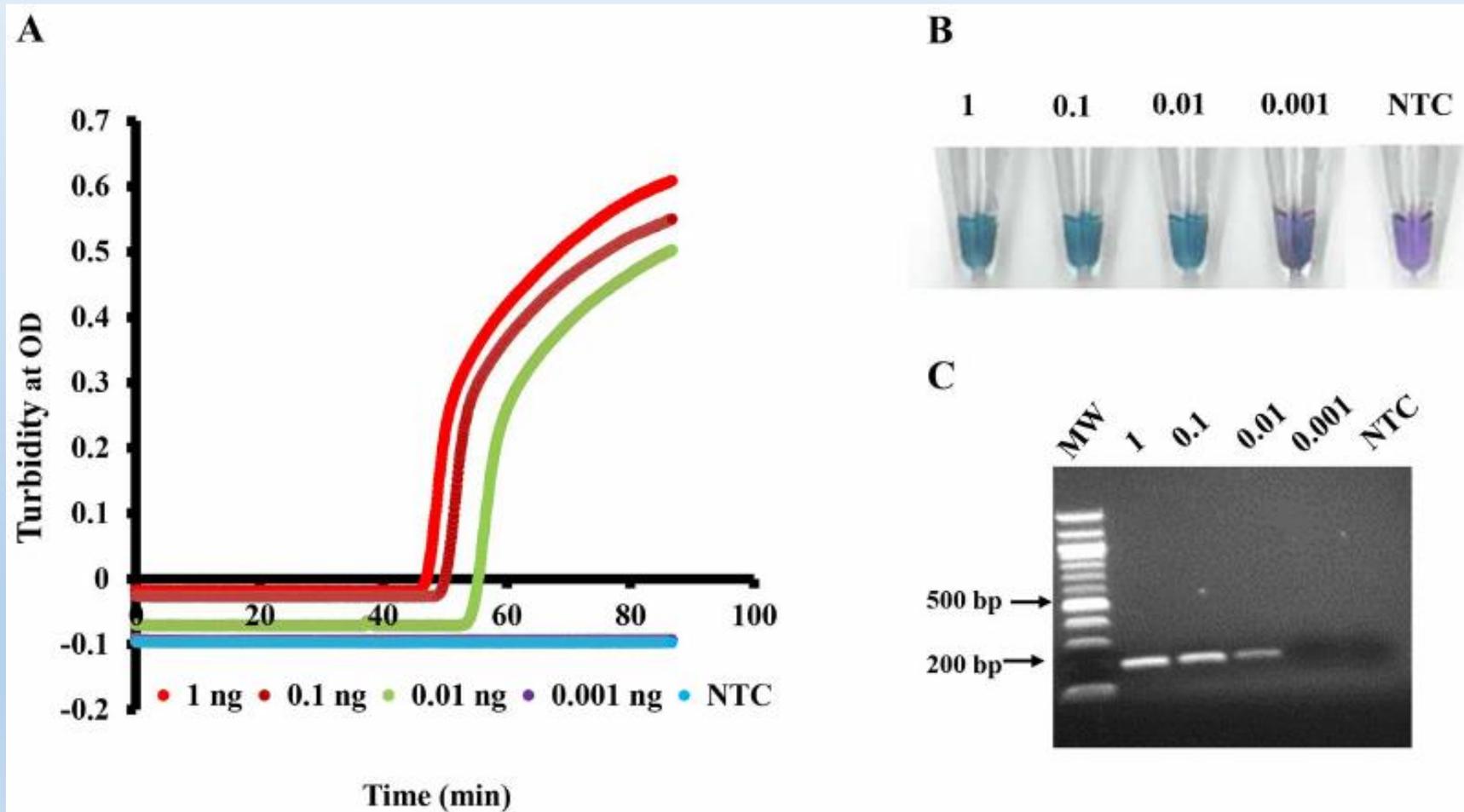
Detecção molecular de muitos patógenos em alimentos de forma simultânea



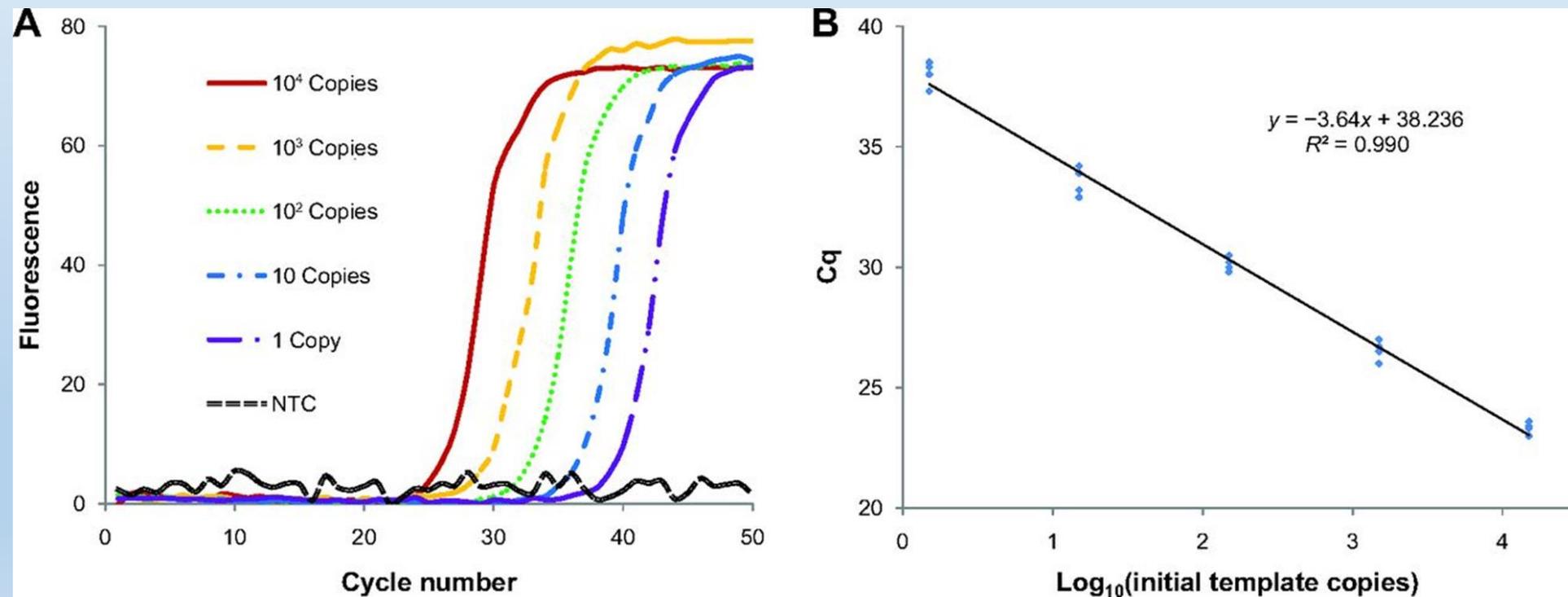
PCR em Tempo Real (quantitativa)



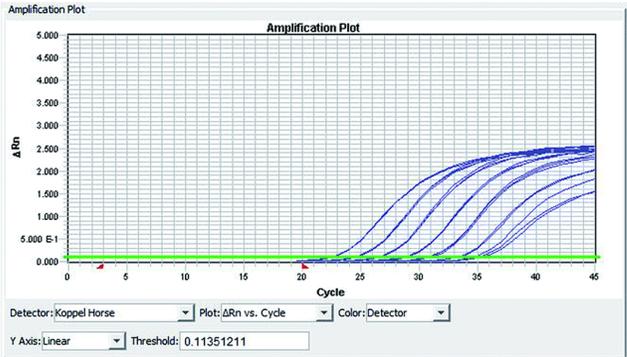
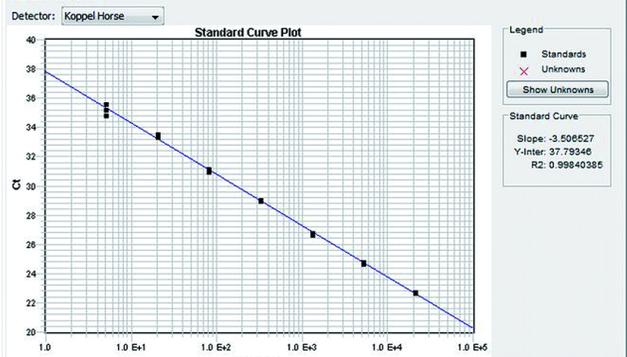
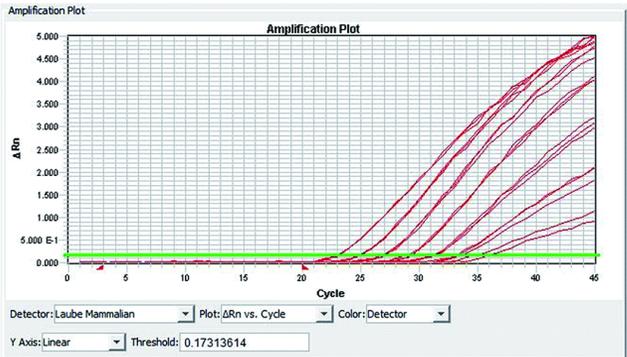
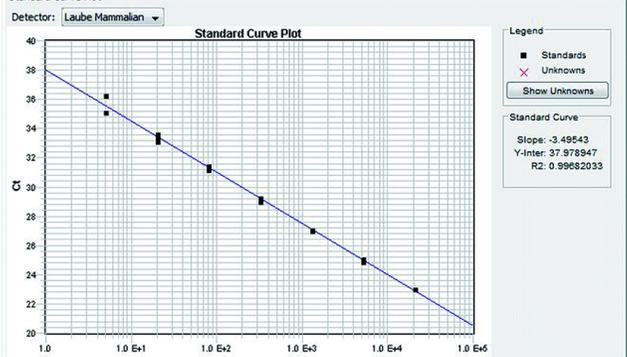
PCR em Tempo Real ou qPCR (quantitativo)



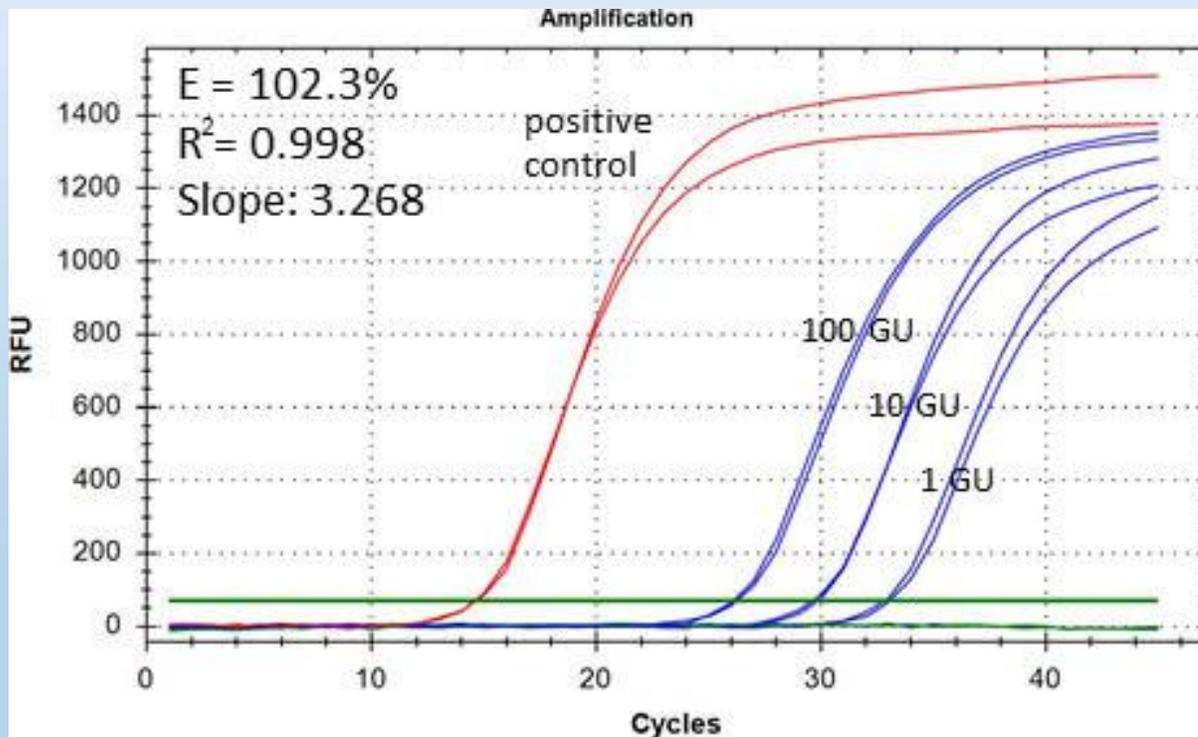
PCR em Tempo Real ou qPCR (quantitative PCR)



PCR em Tempo Real ou qPCR (quantitativo)

Assay	Calibrant Amplification Plots	Calibration Curve
Equine GHR	 <p>Amplification Plot</p> <p>Detector: Koppel Horse Plot: ΔRn vs. Cycle Color: Detector</p> <p>Y Axis: Linear Threshold: 0.11351211</p>	 <p>Standard Curve Plot</p> <p>Detector: Koppel Horse</p> <p>Standard Curve</p> <p>Slope: -3.506527 Y-inter: 37.79346 R2: 0.99840385</p>
Mammalian/Poultry Myostatin	 <p>Amplification Plot</p> <p>Detector: Laube Mammalian Plot: ΔRn vs. Cycle Color: Detector</p> <p>Y Axis: Linear Threshold: 0.17313614</p>	 <p>Standard Curve Plot</p> <p>Detector: Laube Mammalian</p> <p>Standard Curve</p> <p>Slope: -3.49543 Y-inter: 37.978947 R2: 0.9982033</p>

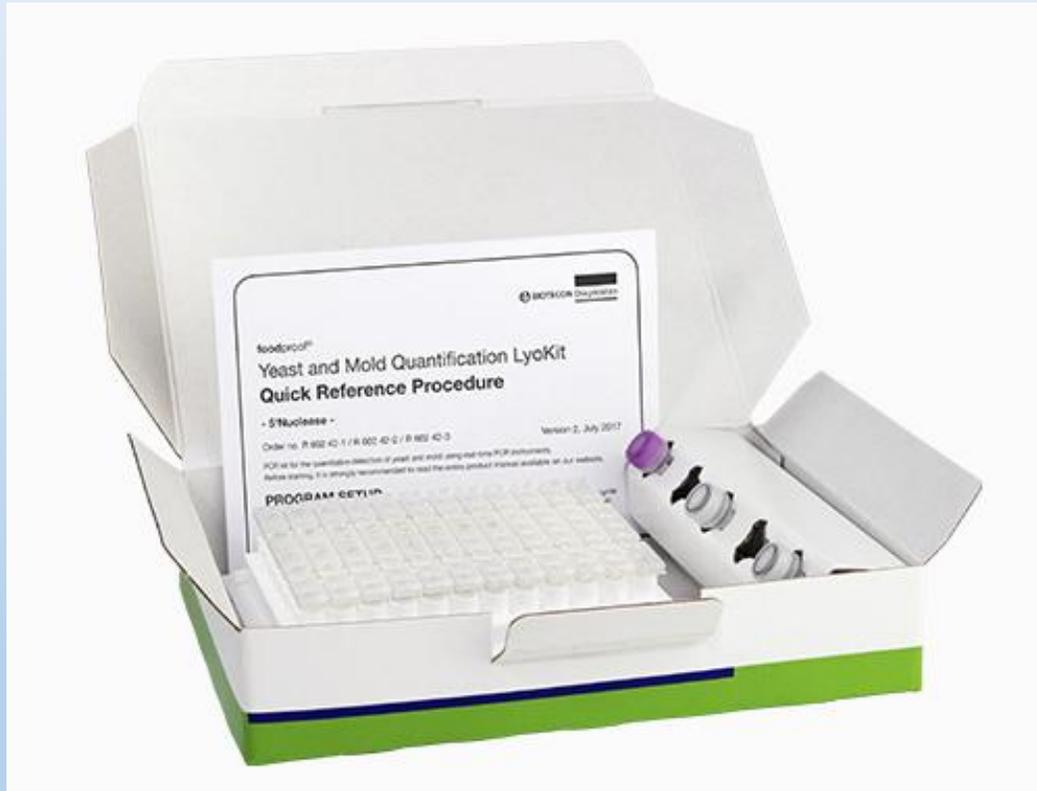
PCR em Tempo Real: identificação da espécie de carne (bovina, suína, caprina, cavalo etc)



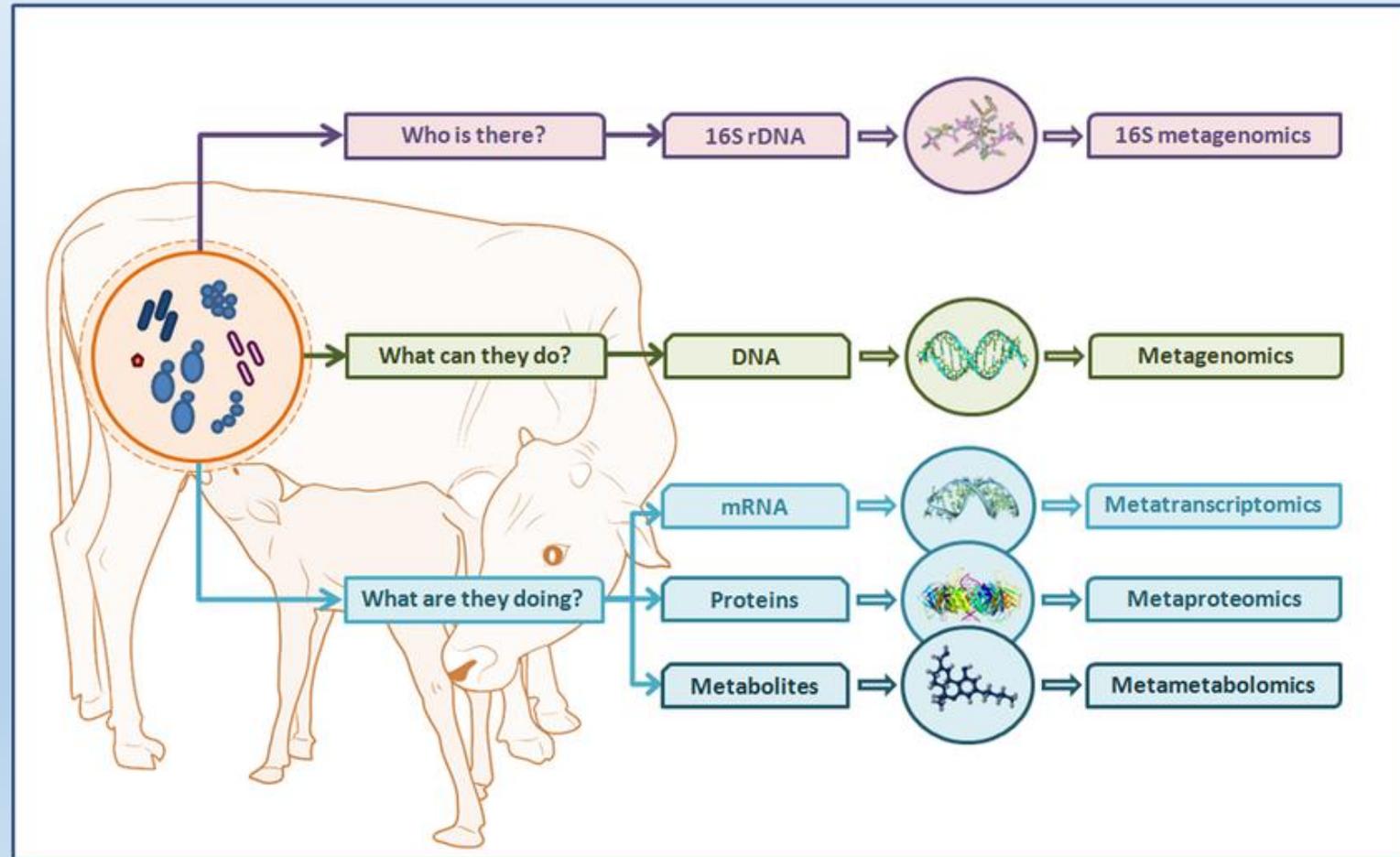
Identificação do tipo de peixe (salmão verdadeiro?) por qPCR



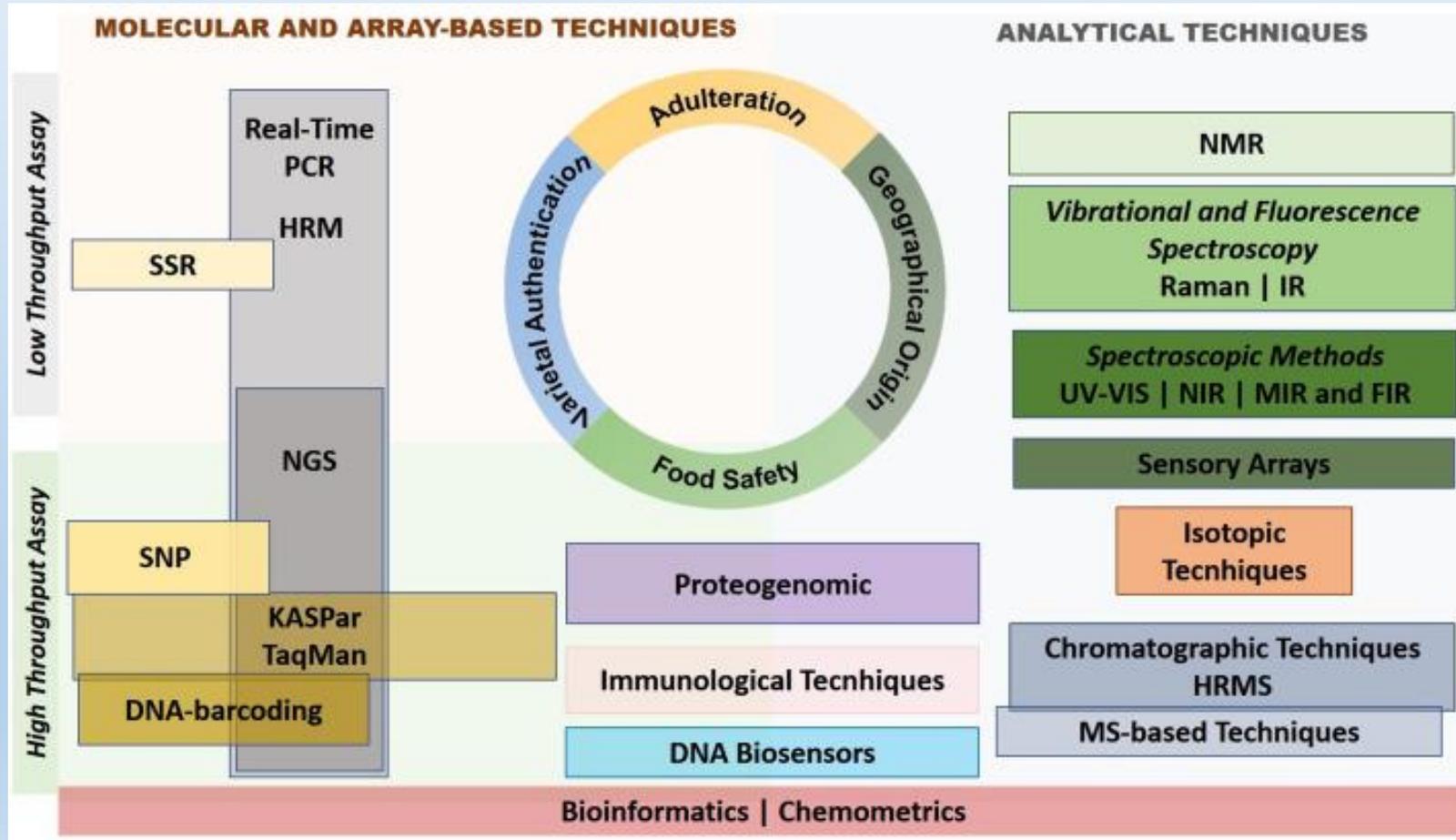
Identificação de fungos e mofo por qPCR



Aplicação das técnicas moleculares à análise de carne



Técnicas moleculares avançadas



Aplicação da nanotecnologia na indústria de alimentos

