

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Carla de Oliveira Rosas

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA MICROBIOLÓGICOS
CERTIFICADOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES

Rio de Janeiro

2018

Carla de Oliveira Rosas

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA MICROBIOLÓGICOS
CERTIFICADOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Vigilância Sanitária.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de
Filippis Capasso

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Rosas, Carla de Oliveira

Desenvolvimento de materiais de referência microbiológicos certificados por métodos fenotípicos e moleculares. / Carla de Oliveira Rosas. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.
186 f: il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.
Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

1. Bactérias de Referência. 2. Brasil. 4 Métodos Fenotípicos. 5. Métodos Moleculares. I. Título.

Development of certified microbiological reference materials by phenotypic and molecular methods

Carla de Oliveira Rosas

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA MICROBIOLÓGICOS
CERTIFICADOS POR MÉTODOS FENOTÍPICOS E MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Janaína Marques Rodrigues Caixeiro (Doutor)
Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Aos meus queridos pais Waldyr (*in
memoriam*) e Ariete.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos: Afonso, Giovanna, João Lucas, minha mãe, minha irmã Danielle e a Sandra por todo o amor, paciência e compreensão dedicado a mim no período deste estudo.

Ao meu orientador Ivano de Filippis pela oportunidade, carinho e confiança no desenvolvimento da tese.

Aos membros das bancas dos seminários do curso de doutorado: Dra. Maysa Mandetta, Dra. Janaina Caixeiro, Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues e a Dra. Raquel Bonelli pelas sugestões para o aprimoramento do trabalho e em especial a Dr. Célia Romão pela participação nas bancas e pela gentileza em revisar o trabalho escrito.

A banca de defesa composta pela Dra. Célia Romão, Dra. Janaina Caixeiro e Dra. Maria Helena Villas Bôas.

Ao Marcus de la Cruz pela constante ajuda na elaboração do projeto da tese e nos cálculos estatísticos.

As companheiras de bancada do Setor de Alimentos/DM Silvia e Valéria, pela grande ajuda, amizade e compreensão no desenvolvimento do projeto. Um agradecimento carinhoso aos amigos de passagem rápida no laboratório, os bolsistas: Cátia, Rodrigo, Natália e aos residentes: Débora, Gisele, Carla, Luiza, Pablo, Ingrid e Mariana.

Aos amigos Marcelo Brandão e Cátia Chaia pelo auxílio na interpretação dos resultados do MLST, na elaboração dos MST e dos dendrogramas.

A equipe do Setor de Esterilidade Processos e Insumos (SEPIN) do Departamento da Qualidade de BioManguinhos/FIOCRUZ, em especial a Luciane Medeiros e a Luciana Veloso pelas análises no equipamento MALDI-TOF.

A Dr. Dália dos Prazeres Rodrigues do LABENT/IOC/FIOCRUZ pelo fornecimento das estirpes de *Salmonella*.

A Plataforma de Sequenciamento do IOC/FIOCRUZ pela realização dos sequenciamentos solicitados.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro através do projeto CNPq/Anvisa que viabilizou a aquisição de todo o material necessário para a realização deste estudo.

RESUMO

As análises realizadas por laboratórios de microbiologia de alimentos exercem um importante papel no suporte às ações da Vigilância Sanitária. Materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC) são considerados ferramentas fundamentais no acompanhamento do desempenho analítico. O uso de MR microbiológicos no controle interno de ensaios analíticos é inquestionável e recomendado pelos principais manuais de métodos microbiológicos oficiais. No Brasil, as cepas de referência utilizadas como controle interno de ensaios são obtidas de provedores internacionais. Os altos custos para aquisição e os requisitos, burocráticos e sanitários, para a importação de materiais biológicos dificultam sua aquisição. Uma alternativa para tornar a utilização das cepas de referência importadas mais acessíveis aos laboratórios brasileiros têm sido a replicação e o fornecimento como cepas derivadas. Contudo, tais ações podem ser comprometidas por regras impostas por provedores, assim como, por barreiras relacionadas à biossegurança no mercado internacional. Assim, é clara a necessidade do país em investir no estudo e desenvolvimento desses materiais. O objetivo deste trabalho foi estabelecer três MRC microbiológicos, com estirpes isoladas de alimentos, de acordo com as normas técnicas oficiais de produção e controle. A partir do uso das metodologias do MALDI-TOF e do MLST, foram obtidos perfis proteômicos e moleculares que auxiliaram na seleção das estirpes utilizadas na elaboração dos MR. Foram produzidos três lotes candidatos à bactéria de referência (CBR) de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Os materiais foram aprovados quanto à pureza, viabilidade, homogeneidade e estabilidade. Foram identificados fenotipicamente, genotipicamente e caracterizados molecularmente pelas metodologias do MLST e ERIC-PCR. Os CBR foram testados na rotina de ensaios de dois laboratórios de saúde pública. Os lotes foram também caracterizados pelo sequenciamento de genes espécie específicos. Os lotes de *Salmonella* e de *L. monocytogenes* foram certificados qualitativamente. O CBR de *E. coli* foi caracterizado quantitativamente, porém não foi certificado por apresentar na caracterização qualitativa molecular índice de identidade de 92% na sequência de nucleotídeos do gene *uspA* com sequências do banco de dados do GenBank.

Palavras-chave: Bactérias de referência. Brasil. Métodos fenotípicos. Métodos moleculares.

ABSTRACT

The analyzes carried out by food microbiology laboratories play an important role in supporting the actions of Sanitary Surveillance. Certified reference materials (RM) and certified reference materials (CRM) are considered key tools in monitoring analytical performance. The use of microbiological reference materials in the internal control of analytical assays is unquestionable and recommended by the main official manuals of microbiological methods. In Brazil the reference strains used for internal control of assays are of international origin. An alternative to making the use of imported reference strains more accessible to Brazilian laboratories has been replication and delivery as derived strains. Thus, it is clear the country's need to invest in the study and development of these materials. The aim of this work was to establish three batches of microbiologic CRM, with strains isolated from food, according to the official technical standards of production and control. From the use of the MALDI-TOF and MLST methodologies, were obtained proteomic and molecular profiles that aided the selection of the strains used in the elaboration of MR. Three RBC of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* were produced. Were identified phenotypically, genotypically and molecularly characterized by MLST, ERIC-PCR and tested in the routine of two public health laboratories. Materials were also characterized by the sequencing of specific species genes. The batches of *Salmonella* and *L. monocytogenes* were qualitatively certified. *E. coli* RBC was quantitatively characterized but was not certified to present a 92% identity index on the nucleotide sequence of the *uspA* gene with sequences from the GenBank database.

Key-words: Reference Bacteria. Brazil. Phenotypic methods. Molecular methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Genes alvo, iniciadores, ciclos de amplificação e referências metodológicas dos protocolos aplicados na identificação genotípica.....	51
Quadro 2. Genes conservados de <i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i> utilizados na metodologia do MLST, condições das reações e produtos da PCR	54
Quadro 3 – Sequência de prime do gene <i>uidA</i>	65
Figura 1. Identificação genotípica de <i>Salmonella</i> Typhimurium com alvo no gene <i>STM 4497</i>	70
Figura 2. Identificação genotípica de <i>Escherichia coli</i> com amplificação do gene <i>uspA</i>	70
Figura 3. Identificação genotípica de <i>Listeria monocytogenes</i> com alvo nos genes <i>inlAB</i>	71
Figura 4. <i>Minimum spanig tree</i> (MST) dos ST das estirpes de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	74
Figura 5. <i>Minimum spanig tree</i> (MST) dos ST das estirpes de <i>E. coli</i>	77
Figura 6. <i>Minimum spanig tree</i> (MST) dos ST das estirpes de.....	80
Figura 7. Perfil proteômico por MALDI-TOF dos isolados e das cepas de referência de <i>S</i> Typhimurium	84
Figura 8. Perfil proteômico dos isolados e das cepas de referência de	85
Figura 9. Perfil proteômico dos isolados e das cepas de referência de	86
Figura 10. Variação da concentração de células dos Sub-lotes do CBR <i>S.</i> Typhimurium ao longo de 356 dias de estoque a -20 e a -70 °C.....	95
Figura 11. Variação da concentração de células do CBR <i>E. coli</i> ao longo de 356 dias de estoque a -20 e a -70 °C	96
Figura 12. Variação da concentração de células do CBR de <i>L. monocytogenes</i> ao longo de 375 dias de estoque a -20 e a -70 °C	98
Figura 13. Variação da concentração diária de células dos Sub-lotes 1 e 2 do CBR <i>S.</i> Typhimurium durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C	101
Figura 14. Variação da concentração diária de células do CBR <i>E. coli</i> durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C	102
Figura 15. Variação da concentração diária de células do CBR <i>L. monocytogenes</i> durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C	103

Figura 16 Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR <i>E. coli</i>	108
Figura 17 Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR <i>L. monocytogenes</i>	108
Figura 18 Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR de <i>S. Typhimurium</i>	108
Figura 19 Perfil de bandas representativo da RAPD no estudo da uniformidade genética do lote CBR de <i>S. Typhimurium</i>	109
Figura 20 Identificação da <i>Escherichia coli</i> com amplificação do gene <i>uidA</i>	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfis de alelos das estirpes de <i>Salmonella</i> Typhimurium avaliadas pelo MLST.....	72
Tabela 2. Perfis de alelos das estirpes de <i>Escherichia coli</i> avaliadas pelo MLST.....	75
Tabela 3. Perfis de alelos das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> avaliadas pelo MLST. 78	
Tabela 4. Resultados das contagens da homogeneidade dos sub-lotes do CBR de <i>S.</i> Typhimurium obtidas em UFC.mL ⁻¹ e em log	88
Tabela 5. Resultados das contagens da homogeneidade dos sub-lotes do CBR de <i>E. coli</i> obtidas em UFC.mL ⁻¹ e em log	89
Tabela 6. Resultados das contagens da homogeneidade do lote CBR de <i>L. monocytogenes</i> obtidas em UFC e em log.....	89
Tabela 7. Resultados do teste da homogeneidade dos sub-lotes produzidos pela análise da variância (ANOVA).....	90
Tabela 8. Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de <i>S.</i> Typhimurium	91
Tabela 9. Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de CBR <i>E. coli</i>	92
Tabela 10. Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de CBR <i>L. monocytogenes</i>	92
Tabela 11. Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e	94
-70 °C do Sub-lote 1 do CBR <i>S.</i> Typhimurium	94
Tabela 12. Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 1 do CBR <i>S.</i> Typhimurium a -20 e -70 °C	94
Tabela 13. Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 °C e -70 °C do Sub-lote 2 do CBR <i>Salmonella</i> Typhimurium	95
Tabela 14. Análise de resíduos de regressão linear do sub-lote 2 do CBR <i>S.</i> Typhimurium a.....	95
-20 e -70 °C.....	95
Tabela 15. Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e	95
-70 °C do CBR <i>E. coli</i>	96

Tabela 16. Análise de resíduos de regressão linear do CBR <i>E. coli</i> a -20 e -70 °C ..	96
Tabela 17. Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e ..	96
-70 °C do CBR <i>L. monocytogenes</i> ..	97
Tabela 18. Análise de resíduos de regressão linear do CBR <i>L. monocytogenes</i> a -20 e	97
-70 °C ..	97
Tabela 19. Análise de resíduos de regressão linear do sub-lote 1 do CBR ..	98
de <i>Salmonella</i> Typhimurium a -20 °C, durante 225 dias de armazenamento ..	98
Tabela 20. Análise de resíduos de regressão linear do CBR de <i>L. monocytogenes</i> a -20 °C, durante 165 dias de armazenamento ..	99
Tabela 21. Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do Sub-lote 1 do CBR de <i>S. Typhimurium</i> ..	100
Tabela 22. Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 1 do CBR de <i>S. Typhimurium</i> a 4 e a 38 °C ..	101
Tabela 23. Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38 °C do Sub-lote 2 do CBR de <i>S. Typhimurium</i> ..	101
Tabela 24. Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 2 do CBR de <i>S. Typhimurium</i> a 4 e a 38 °C ..	101
Tabela 25. Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do CBR de <i>E. coli</i> ..	102
Tabela 26. Análise de resíduos de regressão linear do CBR de <i>E. coli</i> a 4 e a 38 °C ..	102
Tabela 27. Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do CBR de <i>L. monocytogenes</i> ..	103
Tabela 28. Análise de resíduos de regressão linear, do CBR de <i>L. monocytogenes</i> a 4 e a 38 °C ..	103
Tabela 29 - Perfil de alelos no MLST do CRB <i>S. Typhimurium</i> ..	106
Tabela 30 - Perfil de alelos no MLST do CRB <i>E. coli</i> ..	106
Tabela 31 - Perfil de alelos no MLST do CRB <i>L. monocytogenes</i> ..	106
Tabela 32 – Resultado do estudo interlaboratorial para caracterização do CBR <i>E. coli</i> ..	114
Tabela 33 – Valor de referência do estudo interlaboratorial ..	114
Tabela 34 – Dados para o cálculo da incerteza da homogeneidade ..	115

Tabela 35 – Dados para o cálculo da estabilidade de longa duração	115
Tabela 36 – Dados para o cálculo da estabilidade de curta duração	116
Tabela 37 – Valores de referência (V_{ref}) e graus de confiança dos CBR	117

SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
A/E	Attaching and effacing
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA	Análise da variância
APEC	<i>E. coli</i> patogênicas para aves
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênicas
ATCC	American Culture Collection
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BHI	Brain heart infusion
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
CBR	Candidatos à bactérias de referência
CC	Complexos clonais
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CIP	Institute Pasteur
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRB	Centros de Recursos Biológicos
DM	Departamento de Microbiologia
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
eBGs	eBurstGroups
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
EP	Ensaio de proficiência
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênicas
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EUPHAR	<i>European Pharmacopoeia</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> extra intestinal
FAO	Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas

FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IE	Ítems de ensaio
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
ISO	International Organization for Standardization
LABENT	Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LT	Termolábil
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF/MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MLST	Multilocus Sequence Typing
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
MUG	4-metillumbelifril β -D-glicuronídeo
MS	Ministério da Saúde
MQdentro	Média quadrática dentro do material de referência
MQentre	Média quadrática entre os materiais de referência do lote
NCTC	National Collection of Type Cultures
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PNST	possível novo tipo sequencial
SEPIN	Setor de Esterilidade Processos e Insumos
SHU	Síndrome urêmica hemolítica
SSP	Solução salina peptonada
ST	Sequence type

TSA	Ágar tripticaseína de soja
ucar	Incerteza da caracterização
UspA	Universal stress protein A
UTI	Unidade de tratamento intensivo
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
USA	United States of America
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VRBA	Ágar cristal violeta vermelho neutro bile
VRBG	Ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose
WFCC	World Federation for Culture Collections
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Segurança alimentar	17
1.2 Doenças transmitidas por alimentos	17
1.3 Micro-organismos de importância em microbiologia de alimentos	18
1.3.1 <i>Salmonella</i> spp.	18
1.3.1.1 Características do gênero <i>Salmonella</i>	19
1.3.2 <i>Escherichia coli</i>	22
1.3.2.1 Características da espécie	22
1.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	25
1.3.3.1 Características da espécie	25
1.4 Legislações brasileiras para o controle microbiológico de águas e alimentos	28
1.5 O papel do laboratório de controle da qualidade microbiológico de alimentos na vigilância das dta	29
1.6 Métodos de tipificação de micro-organismos	29
1.6.1 Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – MALDI-TOF	30
1.6.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	32
1.6.3 <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>	35
1.6.4 <i>Random Amplification of Polimorphic DNA</i>	36
1.7 Materiais DE REFERÊNCIA MICROBIOLÓGICOS	37
1.8 A preservação de micro-organismos pela liofilização	38
1.9 Regras para o estabelecimento de materiais de referência	40
1.10 Situação do fornecimento e produção de MR Microbiológicos no Brasil e no mundo	42
1.11 JUSTIFICATIVA	43
2 OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 Micro-organismos de referência utilizados no estudo	47
3.2 Triagem bioquímica e sorotipificação das bactérias	47

3.3 Identificação fenotípica	48
3.4 Identificação genotípica	48
3.4.1 Extração e dosagem do DNA.....	48
3.4.2 Protocolos de amplificação por PCR.....	49
3.5 Tipificação molecular dos isolados pelo método mlst	52
3.6 Caracterização proteômica dos isolados	55
3.7 Seleção dos isolados para o preparo dos candidatos a bactéria de referência	56
3.8 Produção dos lotes candidatos a material de referência	56
3.9 Procedimentos de controle dos CBR	57
3.9 1 Estudos da viabilidade, pureza, homogeneidade e estabilidade	57
3.9.1.1 Estudos da viabilidade e da pureza.....	57
3.9.1.2 Teste da homogeneidade.....	58
3.9.1.3 Estudos de estabilidade	60
3.9 2. Identificação e caracterização molecular dos CBR	62
3.9.2.1 Identificação fenotípica.....	62
3.9.2.2 Identificação genotípica.....	63
3.9.2.3 Tipificação molecular pelo MLST	63
3.9.2.4 Tipificação molecular pelo ERIC-PCR.....	63
3.9.2.5 Tipificação molecular pelo RAPD	64
3.10 Estudo colaborativo para o acompanhamento do uso dos CBR	65
3.11 Protocolos de amplificação por PCR do Gene <i>Uida</i>	65
3.12 Caracterização molecular adicional dos cbr pelo sequenciamento dos genes espécie específicos	66
3.13 Certificação dos CBR	66
3.13.1 Certificação dos lotes CBR S. Typhimurium e <i>L. monocytogenes</i>	66
3.13.2 Certificação do lote CBR <i>E. coli</i>	66
3.13.2.1 Cálculo da contribuição incerteza da caracterização.....	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Identificação e tipificação dos isolados	69
4.1.1 Identificação Fenotípica.....	69
4.1.2 Identificação Genotípica	69
4.1.3 Tipificação Molecular pelo Método MLST.....	71
4.1.4 Tipificação Proteômica	80

4.2 Seleção dos isolados e preparo dos lotes cbr	87
4.3 Controle dos lotes de cbr produzidos	87
4.3.1 Estudo da Viabilidade e da Pureza	87
4.3.2 Resultados do Teste da Homogeneidade	88
4.3.3 Resultados do Estudo da Estabilidade	93
4.3.3.1 Estabilidade de Longa Duração	93
4.3.3.2 Estabilidade de Curta Duração (estabilidade de transporte)	100
4.4 Identificação e caracterização molecular dos CBR	104
4.4.1 Identificação Fenotípica dos CBR	104
4.4.2 Identificação Genotípica dos CBR	105
4.4.3 Caracterização Molecular dos CBR pelo Método MLST	105
4.4.4 Caracterização Molecular dos CBR pelo Método da ERIC-PCR	106
4.5 Estudo colaborativo para acompanhamento do uso dos CBR	109
4.6 Caracterização molecular adicional dos CBR pelo sequenciamento de genes espécie específicos	111
4.7 Certificação dos CBR	113
4.7.1 Certificação Quantitativa do CBR <i>E. coli</i>	113
4.7.1.1 Cálculo da Incerteza da Caracterização Quantitativa do CBR <i>E. coli</i>	113
4.7.1.2 Cálculo da Contribuição da Incerteza da Homogeneidade do CBR <i>E. coli</i>	114
4.7.1.3 Cálculo da Incerteza da Estabilidade do CBR <i>E. coli</i>	115
4.7.1.4 Incerteza Combinada do CBR de <i>E. coli</i>	116
4.7.2 Certificação Qualitativa dos CBR	116
5 CONCLUSÕES	119
6 PERSPECTIVAS	121
REFERÊNCIAS	122
APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTUDO	142
APÊNDICE B - PLANEJAMENTOS DA PRODUÇÃO	143
APÊNDICE C – FORMULÁRIOS DO ESTUDO COLABORATIVO	161
APÊNDICE D - CERTIFICADOS DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA	164
ANEXO A - SUPERSPECTRAS - MALDI-TOF	176
ANEXO B - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS CBRs	185

1 INTRODUÇÃO

1.1 Segurança alimentar

A alimentação e a nutrição são condições básicas para a promoção e proteção da saúde, possibilitando a expressão plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania (BADARÓ; AZEREDO; ALMEIDA, 2007).

A proteção da saúde, em todos os estágios da produção alimentar é uma prioridade econômica e de saúde pública, sendo desta forma uma obrigação exercida pelo Estado (TANCREDI; FERNANDES, 2014). Cabe às autoridades reguladoras a responsabilidade da implementação de ações que garantam a saúde e segurança dos alimentos, uma vez que dispõe de competência para estabelecer regulamentos, fiscalizar e avaliar o cumprimento das normas estabelecidas (AZEVEDO; JORGE; AZEREDO, 2016).

No Brasil, as ações de vigilância sanitária na área de alimentos abrangem três esferas de governo divididas entre diferentes níveis de gestão, com interdependência entre as ações. Desta forma, o controle sanitário de alimentos é realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Ministério da Saúde (MS), juntamente com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com as Vigilâncias Sanitárias estaduais e municipais e com os Laboratórios Oficiais de Saúde Pública. Cabe ao Ministério da Saúde, o controle dos alimentos industrializados, com exceção de bebidas. É de responsabilidade do MAPA o registro e fiscalização de produtos de origem animal, vegetais *in natura*, mel, bebidas alcoólicas e sucos (LATORRE, 2013).

1.2 Doenças transmitidas por alimentos

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) abrangem um amplo espectro de enfermidades e constituem um problema de saúde pública em todo o mundo, com implicações no bem estar das populações e na economia das nações. Um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicou, no ano de 2010, uma estimativa de 600 milhões de casos, com 420 mil mortes atribuídas a doenças veiculadas por águas e alimentos (WHO, 2015).

Os agentes responsáveis pelas DTA podem ser de origem química, física ou microbiológica. No entanto, nos últimos 20 anos ocorreu um aumento significativo de doenças causadas por bactérias, vírus e parasitas. Alguns fatores têm contribuído para as mudanças nas taxas dessas doenças, dentre eles: o crescimento das populações, o aumento da expectativa de vida e as mudanças nos hábitos alimentares como o consumo de alimentos crus e daqueles que necessitam somente de aquecimento para serem consumidos (NEWELL et al, 2010).

Segundo dados divulgados pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), somente no ano de 2016 ocorreram nos Estados Unidos da América, 24.029 casos de DTA de origem microbiológica com 98 mortes causadas por patógenos de origem alimentar (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017). No Brasil, informações do MS referentes a casos de DTA de origem microbiológica ocorridos no período de 2007 a 2016, indicam o registro de 6.632 eventos, com 109 óbitos. Do total de casos de DTA registrados 90,5% foram identificados como de fonte bacteriana, 7,1% viral, 1,7% por agentes químicos, 0,7% por protozoários e 0,1% por fungos (BRASIL, 2016). De acordo com Silva e Tancredi (2014), a pequena taxa de eventos de DTA registrados no país se dá pela baixa notificação de casos. Desta forma, os dados divulgados representam apenas uma pequena parcela das doenças efetivamente transmitidas por alimentos no Brasil.

Neste contexto, cabe ressaltar a importância da divulgação do banco de dados da vigilância das DTA, a fim de facilitar o acompanhamento das possíveis tendências e incidência dos micro-organismos envolvidos nessas enfermidades ao longo do tempo (NEWELL et al, 2010). Destaque têm sido dado ao *National Molecular Subtyping Network for Foodborn Disease Surveillance* (PulseNet) coordenado pelo CDC, que através da criação de uma rede de laboratórios públicos participantes dos cinco continentes, realiza a investigação epidemiológica dos surtos de DTA ocorridos no mundo, trazendo grandes benefícios a saúde pública (SEITZ; PREVOTS, 2013).

Entre os micro-organismos prevalentes em DTA estão as bactérias do gênero *Salmonella* e as espécies: *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*.

1.3 Micro-organismos de importância em microbiologia de alimentos

1.3.1 *Salmonella* spp.

1.3.1.1 Características do gênero *Salmonella*

Bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São encontradas no solo, águas, esgoto, assim como no intestino de vários animais. Apresentam-se como bastonetes curtos, Gram negativos, móveis em sua grande maioria devido à presença de flagelos peritríquios. Crescem a 37 °C. São anaeróbios facultativos, oxidase negativa e apresentam habilidade de metabolizar nutrientes tanto por via respiratória, quanto pela fermentativa. Produzem gás a partir da fermentação da glicose e não fermentam sacarose e lactose. Utilizam citrato como fonte de carbono, descarboxilam a lisina e ornitina, não hidrolisam a ureia e geralmente produzem ácido sulfídrico a partir da redução do enxofre (D'AOUST; MAURER, 2007).

Na classificação taxonômica, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A grande maioria das salmonelas patogênicas para humanos e para animais são pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* e estão associadas a quadros de gastroenterites e à febre entérica (SU; CHIU, 2007). Em cada subespécie, são conhecidos diferentes sorovares. Dentre os mais de 2.580 sorovares conhecidos, aproximadamente 1.530 são pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007).

Um monitoramento mundial realizado pela OMS relacionou a distribuição dos sorovares de *Salmonella* responsáveis por casos humanos ocorridos no período de 2001 a 2007. Os resultados indicaram a prevalência dos sorovares *Salmonella enterica enterica* Enteritidis, seguido do *Salmonella enterica enterica* Typhimurium, excetuando-se nos países da América do Norte e da Oceania, onde a posição da prevalência foi invertida (HENDRIKSEN et al, 2011).

A síndrome mais grave causada pela infecção por *Salmonella* em humanos tem sido as febres entéricas (febre tifoide e paratifoide), que consistem em infecções invasivas, causadas pelos sorovares *Salmonella enterica enterica* Typhi e *Salmonella enterica enterica* Paratyphi, patógenos exclusivamente humanos. As manifestações clínicas incluem febre, dores abdominais, diarreia e constipação. A infecção pode gerar danos respiratórios, hepáticos, esplênicos e neurológicos fatais,

com taxa de mortalidade variando de 10 a 20%, caso um antimicrobiano adequado não seja ministrado (FEASEY et al, 2012).

A maioria das salmonelas não tifoídes pode acometer tanto humanos como animais. O contágio em humanos geralmente ocorre como consequência da ingestão de água ou alimento contaminado, com período de incubação de 16 a 72 horas e dose infectante variando de 20 a 10^6 células.

A infecção por *Salmonella*, na maioria das vezes, origina apenas quadros gastroentéricos, não requerendo o uso de antimicrobianos. Entretanto, em aproximadamente 5% dos indivíduos infectados ocorre a evolução da infecção para bacteremia e infecção sistêmica (KARIUKI, 2015). Contudo, a habilidade da estirpe de causar quadros mais graves está atrelada a fatores como quantidade de inóculo ingerido, estado imunológico do hospedeiro e, sobretudo a virulência do sorovar envolvido (LAVIGNE; BLANC-POTARD, 2008).

As salmonelas destacam-se, pela elevada relevância clínica, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos, onde constituem uma das causas mais comuns de DTA e o maior agente de doenças diarreicas (FÁBREGA; VILA, 2013). Majowicz et al (2010) realizaram um levantamento global das gastroenterites por *Salmonella* não tifoide e estimaram um número de 93 milhões de casos anuais, com 155.000 mortes. No Brasil, segundo informações do MS, *Salmonella* spp. foi apontada como o agente mais prevalente nos casos de DTA ocorridos entre 2007 a 2016, estando envolvida em 7,5% das toxinfecções alimentares notificadas no país (BRASIL, 2016).

Nas etapas do processo infeccioso, para sobreviver ao ambiente ácido do estômago, a salmonela sintetiza em torno de 50 proteínas, protegendo o ambiente intracelular do meio externo (FOLEY et al, 2013). Sobrevivendo ao pH ácido, a bactéria chega ao intestino delgado, atravessa a camada de muco e ao atingir o epitélio intestinal realiza contato com enterócitos e com células M das Placas de Peyer. Envia sinais para a célula hospedeira provocando um rearranjo na estrutura do citoesqueleto de actina, facilitando a sua internalização (OLIVEIRA et al, 2013). A bactéria atravessa a célula dentro de um vacúolo endocítico até a lâmina própria onde se multiplica. As salmonelas são fagocitadas pelos macrófagos e monócitos desencadeando uma resposta inflamatória do hospedeiro com liberação de prostaglandinas que estimulam a adenilciclase elevando os níveis de AMPc resultando em aumento de fluido na luz intestinal desencadeando a diarreia aquosa.

Dependendo do sistema de defesa do hospedeiro, as células de defesa que fagocitaram a bactéria e não a eliminaram, retornam aos vasos sanguíneos sendo levadas para o baço e o fígado, dando início a disseminação sistêmica da *Salmonella* (VIEIRA, 2009).

Os fatores de virulência que atribuem à *salmonela* a capacidade de desencadear o quadro patogênico no hospedeiro são codificados por genes que podem estar presentes em elementos genéticos móveis, como transposons ou plasmídeos, assim como fazer parte de regiões específicas do cromossomo, denominadas ilhas de patogenicidade, que são representadas por grandes regiões conservadas do cromossomo, variando de 10 a mais de 100 Kb (FOLEY et al, 2013).

A resistência aos antimicrobianos entre sorovares de *Salmonella* é também considerada um problema de saúde pública mundial. No início dos anos 90, foi registrado um aumento de 20 a 30% no perfil da resistência entre salmonelas não tifoides, chegando a 70% em alguns países no final do último século. Atualmente, a situação tem se agravado pelo surgimento da resistência a classes de drogas importantes no tratamento das infecções por *Salmonella* (CHEN et al, 2013). A taxa de resistência entre as salmonelas varia entre os sorovares. Uma alta taxa de multirresistência, acima de 55%, tem sido encontrada entre estirpes de *S. Typhimurium* (FÁBREGA; VILA, 2013). A dispersão de resistência tem sido atribuída à disseminação de clones de resistência, como a *S. Typhimurium* fagotipo DT 104, que emergiu a partir dos anos 90 do século passado, como um problema de saúde pública global, identificado como agente de doenças tanto em humanos como em animais. A infecção em humanos com isolados DT 104 tem sido associada ao consumo de carnes de frango, bovina, suína e linguças. Estirpes de DT 104 têm apresentando resistência à ampicilina, cloranfenicol, streptomina, sulfonamidas, tetraciclina e cefalosporinas de espectro estendido (CHEN et al, 2013).

Desta forma, a presença do patógeno em alimentos é considerada um risco. Assim, bases legais que estabelecem os critérios microbiológicos para alimentos, em vários países instituem a ausência de *Salmonella* na grande maioria dos alimentos, como um critério de segurança alimentar (FORSYTHE, 2005).

No controle da qualidade microbiológica de alimentos, métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* envolvendo etapas de enriquecimento, isolamento e identificação são ainda os mais utilizados e permanecem como padrão ouro devido à seletividade e sensibilidade que apresentam. Uma variedade de métodos rápidos de

ensaio tem sido propostos e utilizados com a finalidade de diminuir o tempo de análise, como os baseados em reações imuno-enzimáticas, imunomagnéticas, entre outras. No entanto, os métodos rápidos para patógenos servem como triagem e precisam ser confirmados por métodos convencionais. A detecção rápida da *Salmonella* pode ser realizada também por métodos moleculares. A principal ferramenta é a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), que além de propiciar o processo de detecção de patógenos com mais rapidez, em alguns casos, substituiu os tradicionais métodos de identificação, sorotipificação e caracterização bacteriana (ODUMERU; LEÓN-VELARDE, 2012). Como exemplo, pode-se citar a identificação de representantes do sorovar de *S. Typhimurium*, através da reação da PCR utilizando-se o gene *STM4497* cromossomal, com 603 pb que tem como produto uma proteína citoplasmática presente unicamente em representantes do referido sorovar (KIM et al, 2006).

1.3.2 *Escherichia coli*

1.3.2.1 *Características da espécie*

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae e tem como característica principal a apresentação de células em forma de bacilos Gram negativos, não esporulados, fermentadores da glicose e da lactose com produção de ácido e gás. É a espécie predominante da microbiota intestinal normal humana e de animais de sangue quente. A espécie apresenta papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (MENG et al, 2007).

Apesar da característica comensal, algumas estirpes patogênicas podem desencadear quadros de infecção intestinal em humanos, através de águas e alimentos contaminados, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade nas diferentes regiões do planeta. A gravidade da ocorrência de infecções por *E. coli* patogênica é exemplificada por programas de monitoramento de surtos estabelecidos em vários países (CROXEN et al, 2013).

O tamanho do genoma da *E. coli* varia consideravelmente entre estirpes comensais e patogênicas. Análises comparativas mostraram que os genomas são divididos entre genes conservados compartilhados e um conjunto flexível de genes que confere características adaptativas e de virulência, encontradas nas variações

patogênicas (CROXEN et al, 2010). Um gene cromossômico conservado, exclusivamente entre *E. coli* é o *uspA* que produz e regula a produção da proteína citoplasmática denominada UspA (*Universal stress protein A*). Esta proteína tem sua síntese intensificada em condições extremas, como choque térmico, pressão osmótica aumentada, exaustão de nutrientes e presença de agentes tóxicos (NYSTROM; NEIDHARDT, 1992, CHEN; GRIFFITHS, 1998).

As estirpes patogênicas têm adquirido atributos de virulência a partir da aquisição horizontal de genes, através de transposons, sequências de inserção e plasmídeos, que a habilitam a causar manifestações intestinais e extra intestinais (LAVIGNE; BLANC-POTARD, 2008). As *E. coli* patogênicas, mais tradicionalmente conhecidas, são divididas em cinco patotipos caracterizados e agrupados, de acordo com os fatores de virulência, com os quadros clínicos que desencadeiam em humanos e com o perfil filogenético que apresentam.

E. coli enteropatogênicas (EPEC) causam lesão histopatológica, com modificação drástica nas microvilosidades dos enterócitos. Após a aderência na superfície dos enterócitos, translocam proteínas efetoras que desencadeiam modificações no citoesqueleto da célula, com destruição das microvilosidades e formação da estrutura em forma de pedestal, conhecida por *attaching and effacing* (A/E). Esse processo desencadeia a diarreia aquosa, e disfunção na absorção intestinal. Estão entre os principais agentes de diarreia infantil em países em desenvolvimento (CLEMENTS et al, 2012).

E. coli enterotoxigênicas (ETEC) aderem e colonizam o intestino delgado, através de fímbrias sem invadir a mucosa. Produzem toxinas termolábil e/ou do tipo diarreica termoestável, que estimulam o acúmulo de fluidos e o quadro diarreico aquoso (CORRÊA, 2012). As ETEC são consideradas os agentes etiológicos mais comuns dos casos de “diarreia do viajante”. A exposição ocorre geralmente pela ingestão de água ou de alimentos contaminados (CASTRO-ROSAS et al, 2012).

E. coli enteroinvasora (EIEC) penetra nas células epiteliais e causa distúrbios no intestino grosso, provocando febre e diarreia profusa, com muco e sangue, semelhante às infecções causadas por *Shigella*. O processo de invasão é iniciado pela internalização da bactéria nos enterócitos, onde ocorre uma supressão da resposta imune. Posteriormente, bactérias propagam-se lateralmente para as células adjacentes. No local da invasão ocorre um acúmulo de actina e um desarranjo da

estrutura celular levando a manifestações clínicas de pouco agravamento (MENG et al, 2007).

E.coli enterohemorrágica (EHEC) foi originalmente descrita pelo sorotipo O157:H7 por desencadear quadro de colite hemorrágica e/ou Síndrome Urêmica Hemolítica (SHU), na década de 80 do século passado. Desde então, sua vigilância e controle tem se tornado um dos mais importantes focos de saúde pública. Outros sorotipos de EHEC foram também associados à doença e reportados em casos esporádicos em diversos países do mundo (BROOKS et al, 2005). O mecanismo de patogenicidade da EHEC ocorre no intestino grosso e produz lesão de adesão e desvanecimento semelhante ao das EPEC, culminando na destruição das microvilosidades e formação da lesão A/E. Em complemento, produz citotoxinas, que inibem a síntese de proteínas, eventualmente levando a célula à morte. A infecção provoca diarreia, com quadro podendo evoluir para a SHU, enfermidade que gera falência renal e morte (CLEMENTS et al, 2012). Bovinos são conhecidamente os maiores reservatórios de EHEC e geralmente a contaminação da carne se dá pelo contato com o material fecal durante o abate (GYLES, 2007). Águas de enchentes podem contaminar rios, lagos e fontes de água. Alimentos como hambúrguer, linguiça, leite não pasteurizado, cidra de maçã e hortaliças já foram incriminados como fontes de EHEC em surtos passados (CHAURET, 2011). Em 2008 ocorreu nos Estados Unidos o maior surto envolvendo um sorotipo raro O111, com um total de 341 pessoas doentes, 70 hospitalizadas, 25 desenvolveram SUH e uma pessoa morreu. A fonte da contaminação não foi identificada (BRADLEY et al, 2012).

A *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) tem sido identificada como endêmica em todo o mundo. A diarreia é do tipo aquosa persistente, com duração média de 14 dias, podendo apresentar muco e sangue. As bactérias aderem aos enterócitos do cólon em forma de agregados, promovendo uma colonização persistente. Produzem uma toxina termolábil, relacionada antigenicamente à hemolisina e, uma toxina termoestável enteroagregativa (OKHUYSEN; DUPONT, 2010). Estudos apontam esta estirpe como o patógeno bacteriano mais comumente identificado em amostras de fezes diarreicas persistentes em crianças de até cinco anos (PABST et al, 2003; NATARO et al, 2006).

Os procedimentos analíticos para detecção de *E. coli* patogênicas são peculiares e requerem etapas de enriquecimento, isolamento e identificação das

estirpes antes dos testes específicos de virulência, que variam entre testes moleculares, detecção de toxinas, invasividade e aderência em cultura de células, entre outros (FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2017). Os métodos convencionais de controle da *E. coli* não patogênicas em alimentos são realizados através de análises quantitativas baseadas na fermentação da lactose, como a técnica do Número Mais Provável e a do plaqueamento que emprega o ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) (FENG; WEAGANT; GRANT, 2017). Para amostras de água, dentre as técnicas sugeridas está à baseada na atividade da β -glicuronidase, enzima que hidrolisa o substrato 4-metil umbelliferil β -D-glicuronideo (MUG) e libera o composto 4-metil umbelliferona, fluorescente quando exposto à luz ultra violeta (UV) (365 nm). Ainda como opções para análise para água são descritas as técnicas de filtração por membrana e a metodologia colorimétrica que emprega o meio de cultura próprio para o ensaio definido como caldo presença/ausência, com verificação da mudança de coloração a partir da fermentação da lactose (APHA, 2012).

1.3.3 *Listeria monocytogenes*

1.3.3.1 Características da espécie

As espécies do gênero *Listeria* apresentam como características principais, a forma de bastonetes, Gram positivos, não esporulados, anaeróbios facultativos, catalase positiva, móveis por flagelos peritríquios a 25 °C, saprófitas, com baixo conteúdo G+C de 36-39% (SWAMINATHAN et al, 2007). *Listeria monocytogenes* compõem o gênero com outras dezoito espécies (LPSN, 2018). As espécies são diferenciadas fenotipicamente por provas de fermentação de açúcares e pela atividade hemolítica (LIU, 2013). A espécie *L. monocytogenes* é considerada a principal do gênero, por ser patogênica tanto para humanos como para animais (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

A sorotipificação, da *L. monocytogenes* identifica 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7). A importância da diferenciação se dá na determinação da prevalência dos sorotipos em estudos epidemiológicos e no conhecimento da distribuição ambiental (LIU, 2013). Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c são conhecidos como agentes da maioria dos casos de infecção por *L. monocytogenes* em humanos e o sorotipo 4b o mais prevalente em quadros de

toxinfecção alimentar. No entanto, todos os sorotipos carregam os mesmos fatores de virulência, apresentando assim atributos potenciais para acarretar a infecção denominada listeriose (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

Os sorotipos de *L. monocytogenes* são distribuídos em três linhagens evolutivas, com nichos ecológicos diferentes: linhagens I (1/2b, 3b, 3c e 4b), linhagem II (1/2a, 1/2c, 3a) e linhagem III (4a, 4c, 3a). As cepas de linhagem II são encontradas em alimentos, parecem ser generalizadas nos ambientes naturais e agrícolas, e também são comumente isoladas de casos de listeriose animal e casos clínicos esporádicos humanos (LOMONACO; NUCERA; FILIPELLO, 2015).

L. monocytogenes é um microrganismo patogênico, transmitido através de alimentos, considerado um importante problema de saúde pública. A espécie apresenta características peculiares como a ampla distribuição na natureza e a habilidade de crescer em condições ambientais extremas como: pH baixo, elevadas concentrações de sais e baixas temperaturas, que facilitam a sua entrada em plantas de produção de alimentos. Além disso, apresenta capacidade de sobreviver em alimentos por longos períodos de tempo. Tal versatilidade torna o controle da espécie um grande desafio nas indústrias de alimentos (NOORDHOUT, 2014).

A espécie é descrita como um patógeno atípico, devido principalmente à severidade dos quadros clínicos que desencadeia, com taxas de mortalidade variando geralmente entre 20 a 30%, pelo longo tempo de incubação no hospedeiro de 3 a 70 dias e pela predileção por indivíduos com a imunidade mediada por células T comprometida (SWAMINATHAN et al, 2007). Em indivíduos saudáveis a infecção se apresenta como gastroenterite com febre branda, geralmente auto limitante. No entanto, em imunocomprometidos, mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e crianças, que compõem o grupo de risco para listeriose, pode ocorrer a evolução da infecção para quadros severos como septicemia, meningite e encefalites. Em mulheres grávidas, a infecção pode resultar em nascimento prematuro, aborto espontâneo ou nascimento do feto morto (MCLAUHLIN, 2004).

O sucesso da infecção depende da habilidade do patógeno conseguir realizar a internalização nas células no epitélio intestinal. O processo ocorre através da interação da proteína internalina, expressa na célula bacteriana com a caderina da superfície da célula epitelial. Internalizado, o patógeno induz a lise do vacúolo formado durante a entrada, ficando livre no citoplasma da célula hospedeira, onde se multiplica. Utiliza então filamentos de actina, se movimentando pelo citoplasma

chegando à célula vizinha. A bactéria atravessa a camada de células do epitélio e se dissemina pela corrente sanguínea para outros órgãos, como baço e fígado. É então internalizada por macrófagos, onde pode sobreviver e se multiplicar, iniciando o mesmo ciclo inicial. Se o nível de células T da resposta induzida não for suficiente para eliminar as células, pode ocorrer a disseminação pela corrente sanguínea para outros órgãos como cérebro e em gestantes para a placenta (KATHARIOU, 2002).

Surtos de listeriose ocorrem de forma esporádica. Entretanto, a taxa de mortalidade é elevada (NOORDHOUT et al, 2014). No ano de 2011, um surto de grandes proporções, o maior registrado nos Estados Unidos da América, ocorreu no Colorado a partir da ingestão de melões contaminados com os sorotipos 1/2a e 1/2b, resultando na infecção de 147 pessoas e 33 mortes. Em 2013, foi registrado um novo surto acometendo cinco pessoas de quatro diferentes estados dos Estados Unidos da América. Uma morte e um aborto foram registrados. O sorotipo envolvido não foi reportado (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

No Brasil, segundo informações do MS, nenhum surto de *L. monocytogenes* de origem alimentar foi notificado entre 2007 a 2016 (BRASIL, 2016). No entanto, a ocorrência da *L. monocytogenes* no Brasil, tem sido descrita na forma de publicações científicas (BARBOSA et al, 2015, MARTINS et al, 2010, VALLIM et al, 2015).

Os métodos tradicionais de detecção de *L. monocytogenes* são baseados em cultivos com enriquecimentos seletivos, seguidos da identificação da espécie a partir da morfologia colonial em meios com substratos colorimétricos ou cromogênicos; da fermentação de açúcares e da propriedade hemolítica da espécie. Esses métodos são considerados padrão ouro, porém são demorados, sendo muitas vezes incompatíveis para o controle de alimentos que apresentam vida de prateleira curta, assim como na análise de alimentos envolvidos em surtos de DTA. Assim, métodos mais rápidos foram desenvolvidos, como os que utilizam anticorpos e as técnicas moleculares permitindo a finalização de análises em até 48 horas (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

A técnica da PCR é reconhecida como uma técnica reprodutível e de grande importância na identificação e diferenciação da *L. monocytogenes* de outras espécies sendo utilizados genes alvos que carregam fatores de virulência. Jung et al (2003) descreveram a técnica de identificação da espécie *L. monocytogenes* utilizando os iniciadores inIA e inIB derivados dos genes cromossomais *inIA* de 2403

pb e *inlB* com 1893 pb. As internalinas A e B são proteínas de superfície específicas da espécie, conhecidas por estarem associadas à invasão de *L. monocytogenes* em células de mamíferos, principalmente em hepatócitos.

1.4 Legislações brasileiras para o controle microbiológico de águas e alimentos

Avaliações analíticas são ferramentas cujos resultados alicerçam processos de tomada de decisão sobre questões de segurança dos alimentos. As análises de controle microbiológico de alimentos e águas são baseadas em critérios que definem a aceitabilidade de um produto, em função da ausência/presença ou quantidades limites de um micro-organismo, de suas toxinas ou de metabólitos por unidade de massa, volume ou lote (FORSYTHE, 2005).

No Brasil, a legislação sanitária aplicada ao controle da qualidade de alimentos, Resolução N° 12 de 02/01/2001 - MS/Anvisa, atualmente em revisão, institui os critérios microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano (BRASIL, 2012). A resolução estabelece padrões que variam para os diferentes grupos de alimentos, como: ausência de *Salmonella* spp., ausência de *L. monocytogenes* e limites máximos de contaminação para coliformes totais, coliformes termotolerantes; estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus* e clostrídios a 46 °C.

A Portaria N° 2.914, de 12/12/2011 do MS em vigor até setembro de 2017 dispunha sobre os procedimentos de controle da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011). O referido documento foi revogado pela Portaria de Consolidação N° 05 de 28/09/2017 do MS, que consolida as normas sobre as ações dos serviços de saúde (BRASIL, 2017). A atual Portaria mantém como padrões microbiológicos para água de consumo humano: a ausência de coliformes totais e de *E. coli* em 100 mL.

Já a Resolução RDC n° 275 de 22/09/2005 da Anvisa, aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural definindo a ausência de *E. coli* em 100 mL do produto (BRASIL, 2005). Para os demais grupos bacterianos citados na legislação, como coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterococos e Clostrídios sulfito redutores (ou *Clostridium perfringens*), são apresentados opções de padrões, que variam com a

metodologia empregada no ensaio, tais como: “ausência/100 mL” ou dos limites de “1 UFC/100 mL” ou “1,1 NMP/100 mL.

1.5 O papel do laboratório de controle da qualidade microbiológico de alimentos na vigilância das DTA

Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) encontram-se integrados ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária compondo a Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade coordenado pela Anvisa e realizam, a avaliação de serviços e de produtos sob apreensão fiscal verificando o cumprimento das leis, auxiliando nas ações da vigilância sanitária, participando de programas de monitoramento e realizando análises de alimentos e águas envolvidos em surtos de DTA (LUCCHESI, 2001). Atualmente, o Brasil conta com 27 LACEN distribuídos nos 26 estados brasileiros e um no Distrito Federal (BRASIL, 2018).

A finalidade principal de um laboratório analítico é a produção de dados de alta qualidade e adequados ao propósito pretendido. A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios de ensaio é uma tendência mundial e têm como objetivo a promoção de melhorias no planejamento, na organização, no registro dos dados e na documentação dos procedimentos empregados no laboratório, desde a amostragem até a liberação dos resultados (CARDOSO, 2008, MORAES, 2014). A norma ISO/IEC 17025 tem sido o sistema de qualidade mais amplamente empregado entre os laboratórios de ensaios analíticos. Dentre os requerimentos técnicos indicados na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 para a garantia da qualidade dos ensaios, estão: o emprego de metodologias oficiais, a utilização de materiais de referência para o controle interno de ensaios e a participação do laboratório em ensaios de proficiência (ABNT, 2017a).

1.6 Métodos de tipificação de micro-organismos

Métodos de tipificação proporcionam importante aplicação na diferenciação de isolados bacterianos de espécies distintas ou de uma mesma espécie. Podem ser usados para avaliar se duas ou mais estirpes apresentam relações ancestrais. São ferramentas rápidas, precisas e eficientes na vigilância de doenças e na detecção de surtos. A escolha de um método de subtipificação apropriado depende

significativamente da aplicação pretendida e do objetivo da subtipificação dos isolados (WIEDMANN, 2002).

1.6.1 Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – MALDI-TOF

A tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS) tem emergido como uma ferramenta rápida, sensível, altamente confiável e com um amplo espectro de identificação de micro-organismos, abrangendo bactérias, fungos e vírus (DE CAROLIS et al, 2014).

O método tem sido utilizado no estudo de proteínas, proporcionando perfis espectrais de massa, específicos para gêneros, espécies e subespécies bacterianas (FREIWALD; SAUER, 2009). Na metodologia do MALDI-TOF/MS as amostras são aplicadas juntamente com uma matriz polimérica, composta por uma mistura de água, solventes e um ácido forte. Os solventes da matriz penetram na parede celular bacteriana, tornando as proteínas intracelulares acessíveis à análise. Uma grande porcentagem dos picos detectados no espectro do MALDI-TOF/MS é constituída por proteínas com funções conservadas, correspondendo principalmente a proteínas ribossomais, proteínas estruturais e proteínas regulatórias, que são estáveis e podem ser empregadas como biomarcadores filogenéticos (ANGELETTI, 2016). Após a evaporação dos solventes, inicia-se um processo onde moléculas de proteínas e outros compostos celulares são cristalizados junto à matriz. O material cristalizado é então irradiado com um feixe de laser, geralmente de N₂. A captação de energia do laser desencadeia a sublimação e ionização da matriz e da amostra em fase gasosa. Uma vez ionizadas, proteínas migram por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, onde os íons são separados, de acordo com o peso molecular da proteína. Desta forma, cada molécula detectada, gera um pico ou espectro, sendo assim estabelecido um perfil de espectros ou proteoma, para cada micro-organismo analisado. Como a composição de proteínas difere entre as espécies bacterianas e mesmo entre estirpes da mesma espécie, diferentes espectros serão gerados, permitindo a discriminação entre os micro-organismos estreitamente relacionados (CLARK et al, 2013). Os espectros obtidos são identificados a partir de análise comparativa com uma base de dados contendo referências de perfis de espécies microbiológicas relevantes (WELKER; MOORE, 2011, DE CAROLIS et al,

2014). Em geral, os espectros de massas gerados nas análises são únicos para os organismos individuais, com picos específicos para gêneros e espécies. Quando o espectro de massas do isolado teste é confrontado com o banco de dados de espectros de referência; os organismos mais estreitamente relacionados são identificados com um valor fornecido quanto ao nível de confiança na identificação. Quanto mais alto o valor do nível de confiança, mais exata será a identificação do organismo com relação à família, gênero ou nível de espécie (PATEL, 2015).

Espécies devem ser representadas por variados isolados, assegurando que o banco de dados cubra a variabilidade natural existente no grupo. A confiabilidade da identificação é avaliada pelo “*score value*” que o método fornece após a obtenção do espectro de análise e da avaliação estatística. Scores com baixos resultados são rejeitados (WELKER; MOORE, 2011).

A precisão da técnica é aumentada, quando a identificação é feita a partir de uma cultura, com biomassa acima de 10^5 células. Outro ponto de destaque é a elevada influência da qualidade do banco de dados na interpretação dos resultados (BAILEY et al, 2013).

Autores abordam a utilização da metodologia MALDI-TOF na caracterização bacteriana. Dieckmann e Malorny (2011) avaliaram 913 estirpes de *S. enterica* subsp. *enterica*, representando 89 diferentes sorovares. Biomarcadores, baseados na combinação de gênero, espécie, sub-espécie e sorovar foram selecionados, para a identificação de sorovares, mais prevalente como: Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis, Hadar, Choleraesuis, Heidelberg e Gallinarum. O estudo indicou a metodologia do MALDI-TOF como um método rápido e adequado na identificação dos sorovares de importância epidemiológica, reduzindo o número de amostras a serem identificadas pela sorotipificação convencional.

Schaumann et al (2013) utilizaram o MALDI-TOF com excelentes resultados, na identificação e diferenciação das espécies *Shigella sonnei* e *E. coli* e, na distinção dos sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*. Além disso, reportaram a capacidade do método de diferenciar estirpes de *E. coli* enterohemorrágicas e *E. coli* enteropatogênicas de cepas de *E. coli* não patogênicas.

Barbuddhe et al (2008) empregaram as técnicas de MALDI-TOF e do *Pulsed Field gel electrophoresis* (PFGE) na caracterização de 146 isolados de *Listeria*, envolvendo isolados clínicos e provenientes de surtos de intoxicação alimentar. Foram identificadas seis espécies. Os isolados classificados como *L.*

monocytogenes foram corretamente separados em sorotipos, com resultados correspondentes entre as duas técnicas.

1.6.2 *Multilocus Sequence Typing*

Multilocus Sequence Typing (MLST) tem sido descrito como um método molecular amplamente utilizado na tipificação de micro-organismos, em pesquisas epidemiológicas e em sistemas de genética de populações. O método se baseia no acompanhamento de possíveis variações em fragmentos específicos de sete genes constitutivos conservados, denominados *housekeeping*, distribuídos pelo cromossomo bacteriano (MAIDEN et al, 1998). Esses genes são comuns entre seres de uma espécie e apresentam taxa de evolução lenta. São responsáveis pela codificação de enzimas essenciais no metabolismo celular (COOPER; FEIL, 2004). Os perfis obtidos são utilizados na determinação da relação genética entre os isolados (FOLEY; LYNNE; NAYAK, 2009).

As informações sobre os genes a serem sequenciados e o protocolo da PCR, são padronizadas e disponibilizadas pelo banco de dados do MLST. Os resultados da sequência de nucleotídeos obtidos são comparados com dados previamente depositados. Numerações são atribuídas a cada um dos sete alelos, definindo assim o perfil de alelos de cada isolado através do *Sequence Type* (ST) (JOOLEY et al, 2001, AANENSEN; SPRATT, 2005).

Inicialmente o método foi desenvolvido e validado para o estudo de clones em uma população de *Neisseria meningitidis*, envolvendo isolados de casos clínicos e de portadores assintomáticos (MAIDEN et al, 1998). Foi também empregado no estudo de caracterização de grande variedade de organismos, dentre eles os envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares.

Noda et al (2011) avaliaram 30 estirpes de *S. Enteritidis* isoladas no Japão no período de 1973 a 2004, de fontes humanas, animais e de amostras de ovo, usando MLST. Em análises anteriores, os isolados foram classificados como pertencentes a nove diferentes fagotipos e a 17 perfis no PFGE. Através dos resultados do MLST foram agrupados em um único perfil, com a mesma sequência, sem nenhuma diferença nucleotídica nos sete genes *housekeeping* estudados. A avaliação sugeriu que *S. Enteritidis* seja de uma linhagem provinda de um único ancestral.

Achtman et al (2012) utilizaram MLST para investigar grupos evolutivos entre espécies de *S. enterica* depositadas em duas coleções de cultura da *University College Cork* e da coleção FXW do *Institut Pasteur*. Foram analisados 4.257 isolados de *Salmonella* de 554 sorovares, originários dos cinco continentes. As cepas foram obtidas de indivíduos saudáveis, enfermos e de fontes ambientais. Os isolados foram sorotipados e submetidos ao MLST. Os resultados indicaram a diferenciação de 1.092 STs, ordenados em grupos geneticamente relacionados chamados de *eBurstGroups* (eBGs). Muitos eBGs foram correspondentes a apenas um sorovar. Contudo, alguns eBGs continham mais de um sorovar. Além disso, isolados do mesmo sorovar foram distribuídos entre diferentes eBGs. Desta forma, a designação dos sorovares não correspondeu à análise evolucionária dos grupos.

O banco de dados *EnteroBase* encontra-se disponível no endereço eletrônico da *University of Warwick* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>), *Salmonella* - Scheme Achtman 7 Gene MLST. A consulta realizada em 04/12/17 indicou o depósito de 122.628 isolados, com análise de 4.456 diferentes perfis alélicos definidos.

A fim de avaliar o poder discriminatório do MLST para *L. monocytogenes*, no primeiro estudo de MLST relatado para a espécie, Salcedo et al (2003) analisaram 62 isolados de diferentes fontes, provenientes de distintas regiões da Espanha. As cepas foram previamente classificadas como pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b e submetidas à análise por PFGE. Foram encontrados 29 perfis alélicos, sendo 22 representados por um isolado. Dois perfis, ST2 e ST6 abrigaram 10 e 14 isolados do sorotipo 4b respectivamente, sugerindo a existência de 2 clones. Três outros perfis: ST7, ST8 e ST9, apresentaram diferenças de apenas um ou dois locus e foram representados por apenas um isolado. Os resultados obtidos foram concordantes com os do PFGE realizados anteriormente. Estudos prévios utilizando outros métodos moleculares revelaram que, apesar da alta diversidade de *L. monocytogenes*, apenas dois clones tem sido responsáveis pela maioria dos surtos detectados nas últimas décadas na Europa e América do Norte. Portanto, as cepas com os perfis ST2 ou ST6 provavelmente devem pertencer aos clones envolvidos em surtos alimentares.

Yde et al (2012) avaliaram o perfil epidemiológico de 12 casos de listeriose, envolvendo o sorotipo 1/2a, ocorridos na Bélgica em 2011. As evidências sugeriam um surto, presumivelmente provocado pelo consumo de queijo produzido no país, a partir de leite pasteurizado. A tipificação molecular dos isolados clínicos, baseada no

perfil em PFGE com as enzimas *Ascl* e *Apal*, indicou uma origem clonal. Perfil clonal semelhante foi obtido quando as cepas foram submetidas ao MLST.

Atualmente o *Instituto Pasteur* disponibiliza no endereço eletrônico: <http://bigsd.b.pasteur.fr/> um banco de dados com informações sobre perfis de alelos do MLST de patógenos de importância em saúde pública, dentre eles a espécie *L. monocytogenes*. Em consulta realizada em 30/11/17 para a *L. monocytogenes* foram encontrados 3.333 depósitos de sequências, com a determinação de 1.352 perfis alélicos diferentes da espécie.

Isolados de *E. coli* envolvidos em infecções extra intestinais são conhecidos como ExPEC. O grupo inclui subgrupos de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) para humanos e *E. coli* patogênicas para aves (APEC). Independente da origem, as estirpes de ExPEC compartilham características (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Surtos de infecções urinárias em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) têm estimulado o interesse de se conhecer o potencial de estirpes de *E. coli* de fonte animal para causarem infecções em humanos. Embora se reconheça que a principal fonte de UPEC causadoras de infecções hospitalares seja da própria microbiota do indivíduo, não está completamente elucidado como clones virulentos habitam o colón em indivíduos sadios. Existem relatos mostrando a possibilidade da transferência de plasmídeos de APEC contribuindo para a virulência das UPEC, através da cadeia alimentar. Uma hipótese é que frangos abriguem clones virulentos de APEC sendo uma possível fonte de contaminação para humanos (RODRIGUEZ-SIEK et al, 2005). Johnson et al (2007) aplicaram a metodologia do MLST para avaliar o potencial filogenético entre isolados de APEC e UPEC. Sete genes foram avaliados (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*). Os perfis estudados foram: uma amostra de APEC, cinco cepas de UPEC, duas estirpes de *E. coli* K12 e uma cepa de *E. coli* O157:H7 envolvida em quadro de infecção enterohemorrágica. Os resultados mostraram uma correlação muito próxima entre APEC com uma estirpe envolvida em casos de cistite hospitalar e uma estirpe de UPEC proveniente de um quadro de meningite neonatal. As três cepas apresentaram o mesmo perfil alélico (ST95). Duas outras estirpes, uma isolada de infecção de UTI e outra de um caso de cistite, também apresentaram o mesmo perfil alélico ST93 e uma correlação bem próxima a APEC. As outras três estirpes, não apresentaram correlação com a APEC. As duas cepas K12 com perfil ST10 e a cepa O157:H7 com perfil ST11 apresentaram-se mais distantes da APEC que os outros genomas estudados. O

estudo evidenciou que pelo menos alguns isolados humanos e de aves são altamente similares entre si e sugere a possibilidade de uma ligação entre cepas de APEC e UPEC envolvidas em surtos alimentares.

O banco de dados *EnteroBase* encontra-se disponível no endereço eletrônico da *University of Warwick* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) *Escherichia/Shigella*, *Scheme Achtman 7 MLST*. A atualização de 04/12/17 assinalou 71.425 depósitos e a determinação de 7.953 perfis alélicos.

1.6.3 *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

A variabilidade genética de uma espécie bacteriana pode ser verificada a partir da análise de fragmentos de DNA gerados pela amplificação de sequências repetitivas existentes no genoma. Pouco se sabe sobre a origem, evolução ou possíveis funções desses elementos. Muitas espécies bacterianas apresentam tais elementos, enquanto outras não os possuem (WILSON; SHARP, 2006).

As sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias, do inglês *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC), representam um conjunto de sequências conservadas e repetidas, presentes em regiões intergênicas, não codificantes do genoma bacteriano. Constitui um palíndromo imperfeito de 127 pb que ocorre em múltiplas cópias no genoma de bactérias (HULTON; HIGGINS, SHARP, 1991).

O método de tipificação pela ERIC-PCR utiliza como iniciadores elementos repetitivos distribuídos no genoma de micro-organismos, cujas frequências de ocorrência diferem entre espécies e mesmo entre estirpes de uma espécie. Os produtos da amplificação caracterizam perfis específicos, visualizados em distintos padrões de bandas em gel de agarose (WILSON; SHARP, 2006; SMITH, 2012). Tais sequências foram inicialmente identificadas em membros da família *Enterobacteriaceae*, com resultados indicando sequências conservadas, diferindo entre espécies (HULTON; HIGGINS; SHARP, 1991).

Em 2006, Wilson e Sharp utilizaram a ERIC-PCR a fim de investigar a distribuição dos elementos repetitivos na sequência do genoma de nove estirpes de *E. coli*. Os autores evidenciaram um pequeno número de sequências e variações entre isolados com respeito à presença de um elemento entre regiões intergênicas.

Fendri et al (2013) aplicaram a ERIC-PCR, juntamente com a metodologia do PFGE, para tipificar 45 isolados de *Salmonella* derivados de diferentes fontes de alimentos. Os perfis entre os isolados variaram de 3 a 9 bandas. Grande diversidade de perfis entre os sorovares foi encontrada com o uso das duas metodologias.

Em um estudo da diversidade genética de isolados de *L. monocytogenes*, Moreno et al (2013) utilizaram as metodologias de ERIC-PCR e polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP) e compararam os perfis obtidos de isolados de indústria de processamento de carne suína com estirpes de casos de infecção humana. Ambas as técnicas separaram os isolados por sorotipos e por origem, sendo que a ERIC apresentou melhor poder discriminatório, com número de fragmentos variando de seis a nove, com tamanho de 200 a 3.000 pb.

Ardakani e Ranjbar (2016) usaram as metodologias para avaliar 98 cepas de *E. coli*, obtidas de amostras clínicas de pacientes com infecção urinária. A combinação de metodologias propiciou a distinção de seis *clusters*, com bandas variando entre 100 a 3.000 pb, com perfis de 70% de similaridade entre eles.

1.6.4 *Random Amplification of Polimorphic DNA*

Random Amplification of Polimorphic DNA (RAPD) é uma técnica fundamentada na amplificação do DNA genômico com a utilização de pequenos iniciadores que se ligam à sequências nucleotídicas arbitrárias (WILLIAMS et al, 1990). Na aplicação da RAPD, não é necessário conhecimento prévio da sequência alvo a ser amplificada. Uma das características da tipagem por RAPD é a temperatura de anelamento que deve ser relativamente baixa, em torno de 25 a 40 °C, a fim de facilitar à baixa estringência, isto é especificidade entre o primer e as sequências a serem amplificadas. A proximidade, número e localização dessas sequências variam entre organismos sendo esses marcadores eficazes na identificação de polimorfismo no DNA genômico entre indivíduos de uma mesma espécie. Os perfis de fragmentos gerados definem o fingerprinting dos DNA avaliados (POWER, 1996).

RAPD tem sido utilizado na tipificação de diferentes organismos e empregado em estudos epidemiológicos de estirpes bacterianas obtidas de fontes clínicas, de surtos de DTA, assim como de alimentos e animais (LIN et al, 2005).

Quintaes et al (2004) otimizaram a reação da RAPD avaliando oito estirpes de *Salmonella*, serovar Typhi obtidos de diferentes regiões do Brasil. De dezesseis primers utilizados, identificaram o primer 784 como o que apresentou melhor padrão de diferenciação *fingerprint* para os isolados estudados.

Taddele et al (2011) empregaram o RAPD na caracterização epidemiológica de isolados de *Salmonella* Gallinarum isoladas de frango de distintas regiões da Índia, com os primers: NSC I, NSC II, NSC III, URP-6 e 1290. Os autores verificaram que a análise com o primer NSC II resultou em um maior número de perfis entre os isolados, comparado com os outros primers utilizados no estudo, sendo capaz de gerar perfis diferenciados, de acordo com as regiões de origem dos isolados.

Akinyemi e colaboradores (2014) aplicaram o RAPD na tipificação de 63 isolados de *Salmonella*, de cinco diferentes sorovares suspeitas de apresentarem resistência a cefalosporinas. Obtiveram a diferenciação em quatro distintos perfis de RAPD, utilizando o primer OPA4, que separou os isolados pelo local onde foram obtidos.

1.7 Materiais de referência microbiológicos

Segundo o guia ABNT ISO GUIA 30, um material de referência (MR) é definido como um material suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, estabelecido como adequado para o uso pretendido em um processo de medição. Um MR é considerado material de referência certificado (MRC), quando além de atender as especificações de um MR, é também caracterizado por um procedimento válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor da propriedade, sua incerteza e rastreabilidade associadas (ABNT, 2016).

Na microbiologia, MR são descritos como cepas de referência, podendo ser também representados por partes replicáveis de micro-organismos como DNA genômico e plasmidial (BAETS et al, 2009, VAN IWAARDEN et al, 2006) ou por toxinas produzidas por esses organismos (WEISEMANN et al, 2015, ZELENY et al, 2015). A grande dificuldade no estabelecimento de materiais biológicos está na manutenção da viabilidade e da estabilidade das células (PHILLIPP et al, 2007).

A utilização de MR microbiológicos é essencial em atividades como: estudos taxonômicos, validação de metodologias, identificação de patógenos, testes de

sensibilidade a antimicrobianos, pesquisas científicas e controle da qualidade de ensaios laboratoriais (DAY; STACEY, 2008).

A prática do uso de cepas de referência tem sido descrita na maioria dos manuais de métodos microbiológicos oficiais, tais como: métodos microbiológicos da *International Organization for Standardization* (ISO), *Bacteriological Analytical Manual – Food and Drug Administration* (BAM/FDA, 1998), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001), Instrução Normativa N° 62 do Ministério da Agricultura - Métodos Microbiológicos para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003), *Microbiology Laboratory Guide book of United States Department of Agriculture* (USDA, 1998), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), *European Pharmacopoeia* (EUPHAR, 2016), *The United States Pharmacopeia* (USP, 2016), Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), entre outros.

No contexto, da garantia da qualidade laboratorial, MR são considerados ferramentas fundamentais no acompanhamento do desempenho analítico, podendo ser empregados como controle interno das análises ou como ítems de ensaio (IE) em ensaios de proficiência (EP). Essas duas diferentes utilizações dadas aos MR são citadas na norma da qualidade ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, como requerimentos técnicos para a garantia da qualidade dos ensaios analíticos (ABNT, 2017^a).

Materiais de referência biológicos certificados, possuem aplicabilidade em processos analíticos mais complexos, tais como: validação e desenvolvimento de métodos, controle em processos de calibração, avaliação de novos meios de cultura, estudos Interlaboratoriais (IN'T VELD, 1998, MOOIJMAN et al, 1992. PHILIPP et al, 2007). Cabe destacar que, sempre que disponíveis MRC devem ser utilizados em ensaios microbiológicos qualitativos ou quantitativos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2015).

1.8 A preservação de micro-organismos pela liofilização

A água presente nas células bacterianas representa um componente crítico nos mecanismos de reação e contribui para a estabilidade das proteínas, do DNA e dos lipídios, além de conferir a ordem estrutural celular. Métodos de dessecação são

empregados com o objetivo de diminuir a água intracelular, a fim de cessar ou retardar o metabolismo, mantendo a estabilidade e a viabilidade celular por longos períodos (MORGAN et al, 2006).

A dessecação por liofilização é um dos métodos mais utilizados na preservação e estoque de materiais microbiológicos por longos períodos. Consiste na retirada lenta de cristais congelados de água por sublimação sob pressão reduzida (CARVALHO et al, 2004) e requer, via de regra, estocagem em atmosfera inerte ou vácuo (SMITH, 2012). Embora alguns trabalhos considerem a liofilização como um método relativamente brando e seguro, os métodos de dessecação são inerentemente severos às células, podendo acarretar perda da viabilidade e induzir a uma série de danos às células mais sensíveis (SCHOUG et al, 2006). Bactérias Gram negativas são mais suscetíveis ao rompimento da parede celular durante o processo de dessecação e reidratação, uma vez que possuem a camada de peptidoglicano mais fina que as Gram positivas (SHINOHARA et al, 2000).

Cabe ressaltar que os procedimentos anteriores à liofilização, a técnica em si, como também a reconstituição do líofilo podem desencadear efeitos indesejáveis aos micro-organismos, como por exemplo, o aumento da permeabilidade da membrana celular e a desnaturação de proteínas sensíveis (PATIST; ZOERB, 2005). A utilização de crioprotetores como carboidratos, proteínas e polímeros tem sido sugerida de modo a aumentar a estabilidade do micro-organismos durante o processo de dessecação, reconstituição e estocagem (CARVALHO et al, 2004, MORGAN et al, 2006).

Os efeitos do uso de carboidratos durante a dessecação das células são diversos. Durante a desidratação de um organismo, moléculas de açúcar podem substituir a água intracelular que hidrata as proteínas da membrana da célula. Os açúcares podem assim, prevenir a desnaturação das proteínas e a transição de fase líotrópica das membranas lipídicas. Este último efeito ocorre quando a água é removida das bicamadas de fosfolipídios, aumentando a interação entre as cadeias e resultando na transição de fase lamelar para a fase gel. Desta forma, a formação da barreira de membrana lipídica pode ser perdida durante a fase de transição. No entanto, quando a dessecação é realizada na presença de açúcares, ocorre a vitrificação que protege e mantém os componentes intracelulares separados, sustentando a estrutura da membrana. A vitrificação extracelular apresenta igual importância, pois promove a separação física das células (WESSMAN et al, 2010).

Organismos resistentes ao processo de liofilização acumulam naturalmente açúcares no meio intracelular, preferencial dissacarídeos como a trealose e a sacarose. Baseados nesses aspectos, estudos indicam que a adição de agentes crioprotetores durante o crescimento bacteriano, como a trealose (STREETER et al, 2003) e a glicose (CARVALHO et al, 2004), pode proporcionar aumento do crioprotetor no citoplasma e conseqüentemente, maior estabilidade e resistecia da membrana celular durante a dessecação (BRANDÃO et al, 2013a, LESLIE et al, 1995, WESSMAN et al, 2010).

1.9 Regras para o estabelecimento de materiais de referência

Atualmente, em consequência das exigências de resultados mais exatos e confiáveis nas áreas tecnológicas e científicas, a demanda por MR de maior qualidade é crescente. Produtores de materiais de referência devem garantir a qualidade de seus materiais, disponibilizando informações de seus produtos sobre a forma de certificados e relatórios, como também demonstrando competência na produção desses elementos, seguindo os procedimentos descritos em normas de padrão internacional e, preferencialmente, sendo acreditados nesses procedimentos. A ABNT NBR ISO 17034:2017 apresenta os requisitos gerais para a competência de produtores de materiais de referência. No documento estão descritas as regras com as quais os MR devem ser produzidos, identificados, controlados e disponibilizados, seguindo as orientações da Norma ISO/IEC 17025 na aplicação dos critérios técnicos (ABNT, 2017a).

A ABNT NBR ISO 17034:2017 destaca a necessidade da elaboração de um planejamento de produção, detalhadamente documentado, e estabelece como requisitos técnicos de controle, a obrigatoriedade da verificação da homogeneidade e da estabilidade dos lotes dos materiais produzidos, citando o ABNT ISO GUIA 35:2012 como orientativo (ABNT, 2017b).

Na avaliação da homogeneidade de MR são verificadas as condições de uniformidade na composição das amostras de um lote a partir de um número de unidades representativas ao tamanho do conjunto. Na avaliação da estabilidade das propriedades de interesse do candidato, os materiais devem ser avaliados frente às condições de armazenamento e transporte adotadas (ABNT, 2017). Lotes produzidos para fins de certificação devem ter os componentes de incerteza da

homogeneidade e da estabilidade incluídos na estimativa de incerteza do valor de propriedade do MRC (ABNT, 2012b).

Com relação à caracterização dos MR, a ABNT NBR ISO 17034:2017 determina a definição clara por uma propriedade quantitativa ou qualitativa. A Norma indica diferentes abordagens de caracterização de um MR: da mais simples, com a utilização de procedimento único de medição de referência por determinado laboratório, até a caracterização por estudo colaborativo envolvendo uma rede de laboratórios. Requer que a caracterização de MRC seja bem especificada, de modo que a propriedade de interesse seja avaliada com rastreabilidade apropriada, e que os procedimentos para a atribuição de valores de propriedades e suas incertezas sejam documentados.

Considerando a dificuldade de aplicação de métodos de medição que possibilitem o estabelecimento de uma cadeia de rastreabilidade, deve-se garantir a rastreabilidade de materiais biológicos que possa ser considerada de referência, assim como é feito, com maior facilidade nas áreas da física e da química, que utilizam padrões físicos e MRC (PEREIRA, 2017).

Em se tratando de MR biológicos, os controles aplicados devem garantir não somente a homogeneidade e estabilidade da concentração de células, mas também a autenticidade do MR, assegurando a manutenção das características fenotípicas e a estabilidade genética do micro-organismo (CAMARÓ-SALA et al, 2015, DÁVALOS; QUEVEDO, 1991, STACEY; DAY, 2007).

Acompanhando uma tendência mundial de incentivo a políticas de desenvolvimento da biotecnologia, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) instituiu a Norma NIT-DICLA-061:2012, que estabelece os requisitos para acreditação das atividades de ensaio e produção de materiais de referência para centros de recursos biológicos (CRB), no domínio micro-organismos, tendo como referência as “Diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico” (OCDE) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012). O documento complementa os requisitos do ABNT ISO GUIA 34:2012, atualmente substituído pela ABNT NBR ISO 17034:2017.

As orientações da NIT-DICLA-061:2012 têm como objetivo auxiliar na garantia de que materiais biológicos sejam autênticos e do mais alto padrão de qualidade. Desta forma, o documento, indica os diferentes controles que devem ser aplicados para assegurar que os elementos preservados de uma coleção microbiológica

tenham as características essenciais mantidas, dentre elas: o controle da pureza da cultura; da viabilidade (capacidade de replicação); da autenticidade da cultura preservada e da integridade do genoma, quando aplicáveis (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2012).

1.10 Situação do Fornecimento e Produção de MR Microbiológicos no Brasil e no Mundo

A prática da produção de MR microbiológicos é antiga em países da Europa (ABDELMASSIH et al, 2011, IN'T VELD et al, 1998, MORGAN et al, 2006, PETERZ, 1992, PHILIPP et al, 2007). No Brasil, o estímulo ao desenvolvimento de tais materiais data da primeira década do século XXI, quando se iniciou no país a busca da autossuficiência no fornecimento interno de MR para uso em ensaios de proficiência. Até então, poucos eram os provedores de EP para ensaios microbiológicos de água e alimentos existentes. Após o período de encorajamento, o cenário se modificou com o desenvolvimento de novos MR microbiológicos (BRANDÃO et al, 2013a, 2013b, 2014, COSTA et al, 2015, ROSAS, 2010), que atualmente são disponibilizados aos laboratórios públicos brasileiros, na forma de oferta de participação em ensaios de proficiência.

Em contrapartida, as cepas de referência utilizadas como controle interno de ensaios no Brasil são obtidas de provedores internacionais, sendo os principais fornecedores: o *American Type Culture Collection (ATCC)*, o *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)*; o *National Collection of Type Cultures (NCTC)* e o *Institute Pasteur (CIP)*. Todos eles acreditados como produtores de materiais de referência. Contudo, os altos custos para aquisição e os requisitos burocráticos e sanitários para a importação de materiais biológicos dificultam a aquisição de cepas de referência pelos laboratórios brasileiros (INCQS, 2008).

Uma alternativa utilizada pelos fornecedores brasileiros, para tornar as cepas de referência internacionais mais acessíveis aos laboratórios do país, tem sido a replicação e posterior disponibilização como “cepas de referência derivadas”. No entanto, existe a possibilidade de mudanças ou imposição de regras por parte de produtores internacionais, que possam impedir esta prática de fornecimento.

Além disso, há uma tendência para o surgimento de barreiras técnicas e comerciais associadas à biossegurança no mercado internacional que podem

dificultar ainda mais o trânsito de produtos biológicos entre países (CANHOS et al, 2007).

Outra problemática a ser abordada, considerando as orientações da Farmacopeia Americana (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2016) e da Farmacopeia Europeia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2016) é o número máximo de cinco repiques no uso de cepas de referência, a fim de minimizar contaminações e alterações fenotípicas e genotípicas. Essas recomendações têm sido aceitas e seguidas por laboratórios e indústrias em todo o mundo.

Desta forma, é clara a dependência do país na aquisição de cepas de referência internacionais e a necessidade de estudos e incentivos para o estabelecimento de materiais microbiológicos nacionais. Neste contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), abriga a Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) e uma coleção de pesquisa de isolados, provenientes de projetos de pesquisa do Instituto, no âmbito da Vigilância Sanitária e Ambiental, que preserva linhagens de bactérias, fungos e arqueas. A CBRVS é o laboratório brasileiro, indicado pela Farmacopeia Brasileira como provedor de materiais de referência microbiológicos para ensaios oficiais de controle da qualidade, e disponibiliza atualmente bactérias de referência derivadas de coleções internacionais para laboratórios e instituições públicas brasileiras, como os LACEN, universidades, hospitais e centros de pesquisa (INCQS, 2017). Desta forma, O INCQS possui estrutura e conhecimento técnico necessário ao desenvolvimento de cepas de referência.

1.11 Justificativa

Diante da importância do uso de cepas de referência em diferentes práticas laboratoriais e considerando a ausência atual de produtores de cepas de referência de origem nacional são necessários esforços para o desenvolvimento de materiais de referência microbiológicos brasileiros, certificadas ou não, baseadas em normas técnicas oficiais de produção e controle.

O desenvolvimento de cepas de referência brasileiras, com micro-organismos obtidos no território nacional, permitirá a aplicação de controles de análises com materiais mais próximos à realidade das estirpes circulantes no país.

Cepas de referência produzidas no Brasil, com qualidade reconhecida e custo de produção reduzido, constituirá uma alternativa à utilização de MR de provedores internacionais. Os materiais de referência nacionais contribuirão para a garantia da qualidade dos resultados de ensaios microbiológicos de alimentos realizados nos laboratórios públicos brasileiros, auxiliando na verificação do desempenho analítico e reforçando as ações de monitoramento de alimentos no país.

Uma vez que a técnica de produção desses MR seja desenvolvida, aprovada e reconhecida, outros materiais de referência poderão ser estabelecidos com o objetivo de atender a demanda dos laboratórios brasileiros que necessitam de materiais mais acessíveis, em diferentes áreas da saúde pública e da ciência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer cepas de referência certificadas, a partir de estirpes isoladas de alimentos, para uso em controle microbiológico.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente e genotipicamente as estirpes estudadas;
- Avaliar o perfil do MLST das estirpes estudadas, visando tipificá-las e determinar possíveis novos ST e CC;
- Avaliar o perfil proteômico das estirpes estudadas;
- Selecionar entre estirpes nacionais de *S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, um candidato à cepa de referência de cada espécie;
- Produzir lotes candidatos a cepas de referência e identificá-los fenotipicamente e genotipicamente;
- Analisar a homogeneidade e a estabilidade de longa e de curta duração dos lotes produzidos;
- Verificar a autenticidade dos lotes candidatos à bactéria de referência, caracterizando-os por métodos moleculares;
- Avaliar o comportamento dos lotes na rotina laboratorial;
- Realizar a certificação dos lotes de cepas de referência produzidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em cinco etapas descritas no Apêndice A.

A primeira etapa foi constituída de atividades voltadas para a identificação, tipificação molecular e avaliação do perfil proteômico de isolados bacterianos dos grupos: *S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes* obtidos de fontes de alimentos. Junto aos isolados foram utilizadas cepas de referência, que são indicadas em manuais metodológicos como material de referência para o controle interno de ensaios microbiológicos: *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 23724, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Listeria monocytogenes* ATCC BAA 751.

Na segunda etapa, foi selecionado um isolado de cada grupo, a partir da proximidade dos perfis moleculares pelo MLST e proteômicos por MALDI-TOF com as cepas de referência utilizadas.

Os isolados selecionados foram empregados no desenvolvimento de três distintos lotes de candidatos a bactérias de referência (CBR): CBR de *S. Typhimurium*, CBR de *E. coli* e CBR de *L. monocytogenes*.

A terceira etapa foi caracterizada pelo controle da qualidade dos lotes CBR produzidos, com representantes dos lotes de CBR submetidos à avaliação analítica. Foram primeiramente realizados os testes de viabilidade, pureza, homogeneidade e da estabilidade do lote, critérios essenciais para os MR. Na sequência de ensaios foram realizadas a identificação fenotípica, a identificação genotípica e a caracterização molecular pelo MLST e ERIC-PCR.

Na quarta etapa os materiais foram avaliados por dois Laboratórios Oficiais de Saúde Pública, sendo empregados na rotina de seus ensaios de controle da qualidade de águas e alimentos.

Na última etapa do estudo os MR foram certificados.

As atividades de isolamento dos micro-organismos e produção dos lotes de MR foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS da Fiocruz. Os procedimentos de identificação e tipificação molecular foram desenvolvidos no Setor de Identificação Bacteriana e no Setor de Bactérias de Referência, ambos no DM /INCQS. A caracterização pelo MALDI-TOF foi realizada no Setor de Esterilidade Processos e Insumos (SEPIN) do Laboratório de Controle

Microbiológico (LACOM) do Departamento da Qualidade de BioManguinhos/Fiocruz e o sequenciamento obtido através da Plataforma PDTIS de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz.

As atividades práticas deste estudo foram custeadas com a verba de consumo do Projeto CNPQ/ANVISA CHAMADA CNPq/Anvisa N.º 05/2014, intitulado: Desenvolvimento de Materiais de Referência Certificados para o Controle da Qualidade de Ensaio em Laboratórios Públicos de Microbiologia de Alimentos.

3.1 Micro-organismos de referência utilizados no estudo

As seguintes cepas de referência foram utilizadas no estudo: *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 033), *Escherichia coli* ATCC 23724 (INCQS 048), *Escherichia coli* ATCC 10536 (INCQS 031), *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (INCQS 145), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (INCQS 147), *Listeria grayi* ATCC 25401 (INCQS 588), *Listeria innocua* ATCC 33090 (INCQS 354), *Listeria ivanovii* ATCC 19119 (INCQS 355), *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (INCQS 353), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (INCQS 0266), *Listeria monocytogenes* ATCC BAA 751 (INCQS 673), *Listeria seeligeri* ATCC 35967 (INCQS 589), *Proteus vulgaris* ATCC 13315 (INCQS 315), *Salmonella* Arizonae ATCC 13314 (INCQS 257), *Salmonella* Cholerasuis ATCC 10708 (INCQS 028), *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (INCQS 258), *Salmonella* Gallinarium ATCC 9184 (INCQS 378), *Salmonella* Pullorum ATCC 9120 (INCQS 261), *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (INCQS 084), *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (INCQS 150). Todas as cepas foram fornecidas pela CBRVS do INCQS.

3.2 Triagem bioquímica e sorotipificação das bactérias

Treze isolados de *E. coli* foram obtidos de amostras de hortaliças analisadas no Setor de Alimentos/DM do INCQS, entre os anos de 2011 a 2013. Treze isolados de *L. monocytogenes* foram adquiridos a partir de amostras de cortes de frango resfriados e congelados analisadas no ano de 2014. Os alimentos analisados foram adquiridos em estabelecimentos comerciais do Município do Rio de Janeiro, de forma aleatória. Para as atividades de pesquisa, isolamento e triagem bioquímica das bactérias foram utilizadas as metodologias descritas no *Bacteriological*

Analytical Manual (BAM/FDA, 1998), capítulos: 4 – “Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria” e 10 – “*Listeria monocytogenes*”.

Quatorze isolados de *Salmonella* Typhimurium foram fornecidos pelo Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (LABENT) do IOC/FIOCRUZ. Os isolados foram obtidos entre os anos de 2011 a 2014, a partir de amostras de carnes bovina e suína, frangos, peixes, ovos, saladas e embutidos. Dos 14 isolados, dois foram detectados em análises de rotina e os demais, de amostras envolvidas em doze diferentes casos de surtos de toxinfecção alimentar ocorridos nas regiões Sul (6 casos), Sudeste (3), Nordeste (1) e Centro-Oeste (4) do Brasil.

Todos os isolados utilizados no estudo foram criopreservados em glicerol a 20% e mantidos a temperatura de - 70 °C.

3.3 Identificação fenotípica

Os isolados de *Salmonella* e de *E. coli* foram submetidos à identificação em equipamento semi-automatizado VITEK 2.0 Compact (bioMérieux, France), utilizando o cartão “Gram Negativos fermentadores e não fermentadores” (GN), seguindo as instruções do fabricante. As bactérias de referência: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724, *E. coli* ATCC 10536, *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram empregadas no controle do ensaio.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram avaliados fenotipicamente por meio da utilização do kit API Listeria (bioMérieux, France), de acordo com as instruções do fabricante. As cepas de *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC BAA 751, *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Listeria ivanovii* ATCC 19119 foram utilizadas como controle do teste. A hemólise em ágar de sangue de carneiro a 5% (DIFCO, USA) foi realizada como teste complementar.

Os isolados de *L. monocytogenes* foram encaminhados ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC/FIOCRUZ para a identificação dos sorotipos.

3.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

3.4.1 Extração e dosagem do DNA

A extração do DNA foi realizada através da utilização do *kit DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen®, Germany), de acordo com as orientações do fabricante. A concentração do DNA foi verificada em aparelho NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Os DNA foram diluídos à concentração aproximada de 10 ng/μL.

3.4.2 Protocolos de amplificação por PCR

Os isolados foram submetidos à identificação genotípica pela PCR, através da detecção do gene alvo, comum aos representantes de cada espécie.

Os isolados de *S. Typhimurium* foram identificados genotipicamente, segundo metodologia descrita por Kim et al (2006), com alvo no gene *STM 4497* gerando fragmentos de 310 pb. O gene *uspA* foi empregado na identificação das estirpes da espécie *E. coli* originando fragmentos de 434 pb (CHEN; GRIFFITHS, 1998). Para a identificação dos isolados de *L. monocytogenes* foram utilizados os iniciadores inIA e inIB gerando fragmentos de 902 pb (JUNG et al, 2003). Os genes, os iniciadores, o protocolo de reação, os programas de amplificação empregados nas reações e suas referências são citados no Quadro 1.

A especificidade de cada um dos iniciadores foi verificada no programa “*In Silico PCR amplification*” (<http://insilico.ehu.es/PCR/>).

Para as reações de controle da PCR com os genes alvo foram utilizadas cepas de referência, citadas no item 3.1. Para o gene *STM 4497*, foram empregadas as cepas: *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Arizonae* ATCC 13314, *S. Cholerasuis* ATCC 10708, *S. Enteritidis* ATCC 13076. Para o gene *uspA* foram utilizadas: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724, *E. coli* ATCC 10536, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. aerogenes* ATCC 13048. Para o gene *inIAB* foram empregadas: *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC BAA 751, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119 e *L. seeligeri* ATCC 35967.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore).

Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose (Sigma, USA) a 2% em tampão Tris Acetato EDTA (Invitrogen, USA) 1X, juntamente com marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, USA). O gel foi submetido a eletroforese a

80V/60 min e, após a corrida, corado em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL (Sigma, USA) por 15 min. Em seguida o preparado foi visualizado em digitalizador de imagens (GE Healthcare, Inglaterra) e avaliado através do programa ImageQuant 300.

Quadro 1- Genes alvo, iniciadores, ciclos de amplificação e referências metodológicas dos protocolos aplicados na identificação genotípica

Gene alvo	Iniciadores (5'-3')	Protocolo da Reação (volume 25 µL)	Ciclos de amplificação	Produto	Referência
<i>STM4497</i> <i>S. Typhimurium</i>	Forward AACAAACGGCTCCGGTAATGAGATTG Reverse ATGACAAACTCTTGATTCTGAAGATCG	12,5 µL de MasterMix ¹ ; 1 µL STM4497M2 F [15 pmol/µL] ² ; 1 µL STM4497M2 R [15 pmol/µL] ² ; 5,5 µL de água livre DNase/RNase ³ ; 5 µL do DNA [10 ng/µL].	94 °C – 3 min 94 °C – 45 s 67 °C – 30 s 72 °C – 30 s 72 °C – 3 min	310 pb	Kim et al, 2006
<i>uspA</i> <i>E. coli</i>	Up CCGATACGCTGCCAATCAGT Down ACGCAGACCGTAGGCCAGAT	12,5 µL de MasterMix ¹ ; 4 µL <i>uspA</i> Up [1,25 pmol/µL] ² ; 4 µL <i>uspA</i> Down [1,25 pmol/µL] ² ; 4,5 µL do DNA [10 ng/µL].	94 °C – 5 min 94 °C – 1 min 55 °C – 1 min 72 °C – 2 min 72 °C – 5 min	884 pb	Chen; Griffiths, 1998
<i>inlAB</i> <i>L. monocytogens</i>	AB1 CTTCAGGCGGATAGATTAGG AB3 TTCGCAAGTGAGCTTACGTC	12,5 µL de MasterMix ¹ ; 1 µL <i>inlAB</i> -1 [25 pmol/µL] ² ; 1 µL <i>inlAB</i> -2 [25 pmol/µL] ² ; 5,5 µL de água livre DNase/RNase ³ ; 5 µL do DNA [10 ng/µL].	94 °C – 5 min 94 °C – 2 min 60 °C – 1 min 72 °C – 1 min 72 °C – 10 min	902 pb	Jung et al, 2003

Fonte: Do autor, 2015.

¹- (Thermo Fisher Scientific, USA); ²- (Invitrogen, USA); ³- (BioBasic, Canada).

3.5 Tipificação molecular dos isolados pelo método MLST

A caracterização molecular foi realizada a partir da amplificação de sete genes conservados específicos para cada um dos grupos bacterianos estudados, descritos no Quadro 2. Para as reações, foram utilizados os DNA extraídos anteriormente na etapa de identificação genotípica (item 3.4.1).

No desenvolvimento da PCR-MLST de *Salmonella* foram seguidas as informações do banco de dados: (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica.relacionadas>), referentes aos iniciadores e à temperatura de anelamento. Os procedimentos de amplificação foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Harbottle et al (2006). Os ciclos da reação consistiram em desnaturação inicial de 94 °C/10 min, 34 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/5 min. As informações sobre os genes, iniciadores utilizados, temperaturas de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados estão apresentadas no Quadro 2. Foram utilizadas as cepas: *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 como controle.

Todas as condições dos iniciadores e das reações de amplificação do MLST de *E. coli* foram obtidas no banco de dados: (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). As misturas da reação foram submetidas aos ciclos de: 94 °C/4 min, 30 ciclos de 94 °C/30 s, 52 °C/30 s, 72 °C/2 min e extensão de 72 °C/10 min. Os genes, as temperaturas de anelamento e o os fragmentos amplificados estão indicados no Quadro 2. Foram utilizadas no estudo as cepas: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536.

Para a metodologia do MLST de *L. monocytogenes* foram seguidas as orientações do banco de dados: (<http://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>), relacionadas aos iniciadores e as reações de amplificação. Os ciclos de amplificação foram de: 94 °C/4 min, 35 ciclos de 94 °C/30 s, 52 °C/30 s, 72 °C/2 min e extensão de 72 °C/10 min. A temperatura de anelamento para o gene *bgIA* foi de 45 °C. O Quadro 2, descreve os genes, os iniciadores utilizados, as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação. Foram utilizadas as cepas *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751.

As misturas das reações, informadas no Quadro 2, foram submetidas aos ciclos de amplificação em termociclador *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Singapore).

Posteriormente, os amplicons foram purificados, em microplacas de 96 cavidades, com a utilização do kit *MinElute UF plates* (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi preparada em um volume total de 9 µL, nas seguintes proporções: 0,7 µL de exosap, 1,4 µL de fosfatase alcalina e 7 µL do amplicon da reação. A placa foi submetida a um ciclo de 37 °C por 15 min e 80 °C por 15 min, em aparelho termociclador.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o uso do kit *Big Dye® Terminator Direct Sequencing v 3.1* (Applied Biosystems, USA) em microplacas de 96 cavidades. Para um volume de 10 µL de reação, foram aplicados 1,5 µL do tampão 5X (kit), 2 µL do iniciador a uma concentração de 1,6 pmol, 1 µL do Big Dye e 5,5 µL do DNA purificado. A placa foi levada a aparelho termociclador e submetida a um programa de 40 ciclos, nas seguintes condições: 94 °C/10 s, 50 °C/5 s e 60 °C/4 min.

A precipitação da reação foi realizada com a adição de 30 µL de isopropanol a 75%, em cada um dos orifícios da placa. Foi aplicado um microfilme (Applied Biosystems, USA) cobrindo os orifícios da placa, que posteriormente foi submetida à centrifugação (BOECO Germany, U32-R, Alemanha) a 1000 g/10s. A placa foi deixada em repouso por 15 min, sob o abrigo de luz e centrifugada a 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante da reação foi retirado e adicionados 50 µL de etanol a 75% em cada orifício. Um novo microfilme foi aplicado e realizada nova centrifugação a 4000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e a placa mantida à temperatura ambiente por 2 h, ao abrigo de luz. A placa foi vedada com microfilme e mantida a -20 °C.

O sequenciamento segundo Sanger, foi realizado através da Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC, na qual foi utilizado o Analisador Automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, USA), de acordo com o protocolo de Otto et al (2008).

Quadro 2 - Genes conservados de *S. enterica*, *E. coli* e *L. monocytogenes* utilizados na metodologia do MLST, condições das reações e produtos da PCR

Gene/Produto	Iniciadores	Anelamento	Produto pb
<i>Salmonella enterica</i>			
thrA -aspartoquinase + homoserina desidrogenase	F 5'-GTCACGGTGATCGATCCGGT-3' R 5'-CACGATATTGATATTAGCCCG-3'	55 °C	852
purE -fosforibosilaminoimidazole carboxilase	F1 5'-GACACCTCAAAAAGCAGCGT-3' R2 5'-AGACGGCGATACCCAGCGG-3'	55 °C [61°C]*	510
sucA -alpha quetoglutarato desidrogenase	F1 5'-CGCGCTCAAACAGACCTAC-3' R1 5'-GACGTGGAAAATCGGGGCC-3' F1 5'-GAAACGTTCCATTCGCGC-3'	55 °C [61°C]*	643
hisD -histidinol desidrogenase	R1 5'-GCGGATTCGCGGACCAAG-3' F 5'-CCTGGCACCTCGCGCTATAC-3'	55 °C	894
aroC -corismato sintetase	R 5'-CCACACACGGATCGTGGCG-3'	55 °C [61°C]*	826
hemD -uroporfirinogen III cosintase	F1 5'-GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG-3' R 5'-ATCAGCGACCTTAATACTTGCCA-3'	55 °C	666
dnaN -DNA polimerase III beta sub-unid	F 5'-ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA-3' R 5'-AATTTCTCATTTCGAGAGGATTGC-3'	55 °C	833
<i>Escherichia coli</i>			
Adk -adenilato quinase	F1 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' R1 5'-CCGTCAACTTTTCGCGTATTT-3'	54 °C	583
fumC -fumarato hidratase	F 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' R 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'	54 °C	806
gyrB -DNA girase	F 5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' R 5'-ATCAGGCCTTACGCGCATC-3'	60 °C	911
lcd -isocitrato/isopropilamato desidrogenase	F 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' R 5'-GACGCAGCAGGATCTGTT-3'	54 °C	878
mdh -malate desidrogenase	F 5'-ATGAAAGTCGCAGTCTCCGGCGCTGCTGGCG-3' R 5'-TAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCT-3'	60 °C	932
purA -adenilosuccinato desidrogenase	F 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' R 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	54 °C	816
recA -ATP/GTP motivo de ligação	F 5'-CGCATTCGCTTTACCCGACC-3' R 5'-TCGTGCGAAATCTACGGACCGGA-3'	58 °C	780
<i>Listeria monocytogenes</i>			
abcZ -ABC transportador	F 5'-TCGCTGCTGCCACTTTTATCCA-3' R 5'-CTCAAGGTCGCCGTTTAGAG-3'	52 °C	537
bglA -beta glicosidase	F 5'-GCCGACTTTTTATGGGGTGGAG-3' R 5'-CCGATTAATAACGGTGCGGACATA-3'	45 °C	399
cat -catalase	F 5'-ATTGGCGCATTTTGATAGAGA-3' R 5'-CAGATTGACGATTCCTGCTTTTG-3'	52 °C	486
dapE -succinil diaminop. desuccinylase	F 5'-CGACTAATGGGCATGAAGAACAAG-3' R 5'-CATCGAACTATGGGCATTTTTACC-3'	52 °C	462
dat -minotransferase D-aminoácido	F 5'-GAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA-3' R 5'-CTGCGTCCATAATACACCATCTTT-3'	52 °C	471
ldh -L-lactato desidrogenase	F 5'-GTATGATTGACATAGATAAAGA-3' R 5'-TATAAATGTCGTTTCATACCAT-3'	52 °C	453
lhkA -histidina quinase	F 5'-AGAATGCCAACGACGAAACC-3' R2 5'-CTGGGAAACATCAGCAATAAAC-3'	52 °C	480

Fonte: Do autor, 2015.

*- Temperatura otimizada

As sequências obtidas, exportadas no formato FASTA, foram editadas e analisadas utilizando o programa *Sequencher* e após confirmação da qualidade, foram submetidas aos bancos de dados do MLST para determinação dos ST. As sequências que não apresentaram similaridade de 100% com os alelos existentes, foram encaminhadas aos curadores dos bancos para a definição de novos alelos e posterior depósito. Os isolados estudados foram identificados em tipos sequenciais ST e o possível agrupamento em complexos clonais (CC).

3.6 Caracterização proteômica dos isolados

A caracterização proteômica foi realizada através da técnica de MALDI-TOF e teve como objetivo buscar a similaridade entre os perfis proteômicos dos isolados com os das cepas de referência.

As cepas de referência descritas no item 3.1 foram utilizadas como controle da técnica. A cepa *E. coli* ATCC 8739, foi empregada como calibrador do ensaio.

Primeiramente, as estirpes foram cadastradas no sistema, utilizando-se o software SARAMIS Target Manager (database version 1.12 e System version 3.5.1.3; 2010).

As análises foram iniciadas com a transferência de parte de uma colônia isolada, do crescimento em ágar sangue de carneiro a 5% (DIFCO, USA), para um *spot* de uma lâmina modelo *Flexi-Mass-DS TO-430* (BioMérieux). O procedimento (*spot*) foi realizado em duplicata para cada um dos isolados e em quadruplicata para as cepas de referência. Na superfície de cada poço foi adicionado um microlitro de uma solução matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK MS-CHCA, BioMérieux). A lâmina, com a matriz cristalizada, foi analisada em equipamento VITEK MS RUO (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), com laser de nitrogênio, operando a 337 nanômetros.

Os espectros de massa foram realizados em modo positivo linear, com voltagem de aceleração de + 20 kV. Os resultados foram analisados pelo software SARAMIS Premium (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010). Para cada um dos isolados analisados no MALDI-TOF, foi gerado um espectro de massas *fingerprinting*. Os espectros dos representantes de cada grupo, foram reunidos em *SuperSpectras*, que apresentam informações sobre proteínas conservadas,

identificadas numericamente e representadas por suas relações massa/carga (m/z) (*supermass*).

3.7 Seleção dos isolados para o preparo dos candidatos a bactéria de referência

A partir dos espectros de massa obtidos, foram gerados dendrogramas, que agruparam as estirpes, de acordo com a relação de proximidade dos perfis proteômicos. A partir da visualização dos dendrogramas foram destacados os isolados de cada grupo com maior proximidade com uma das cepas de referência da mesma espécie.

Foi também considerada a similaridade obtida entre os perfis de alelos dos sete genes do MLST, entre os isolados e as referidas cepas.

Três isolados, um de cada espécie, foram selecionadas para o preparo de três lotes CBR. As cepas selecionadas foram depositadas na CBRVS do INCQS/Fiocruz.

3.8 Produção dos lotes candidatos a material de referência

Anteriormente à produção dos lotes, foram elaborados os planejamentos da produção dos três lotes de CBR. Os referidos documentos descrevem todos os procedimentos necessários à produção e ao controle dos materiais e são apresentados no Apêndice B.

Os procedimentos de preparo dos CBR tiveram como base os desenhos descritos por Rosas et al (2010) e Brandão et al (2013). O lote de salmonela foi preparado em solução de leite desnatado a 10% volume contendo 100 mM de trealose (Merck, Alemanha) e os demais em solução de leite desnatado a 10% volume com 100 mM de sacarose (Merck, Alemanha). Os isolados foram cultivados em caldo infusão cérebro coração, do inglês *brain heart infusion* (BHI) (DIFCO, USA) a 35 °C por 24 h. As culturas em BHI de *S. Typhimurium* e *E. coli* foram submetidas a um segundo cultivo em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco, USA) com 10% peso de cloreto de sódio, incubação a 35 °C por 28 h. As culturas de *L. monocytogenes* em BHI e de *S. Typhimurium* e *E. coli* em LB foram centrifugadas a 10.000 g/10 min. Os sedimentos de células de *S. Typhimurium* e *E. coli* foram suspensos em solução de

trealose a 100 mM (Merck, Germany) e o de *L. monocytogenes* em solução de sacarose a 100 mM (Merck, Germany). Para o preparo de cada um dos lotes, a concentração de células foi ajustada em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, Inglaterra) a uma transmitância de 2%, a fim de se alcançar concentração aproximada de 10^9 UFC.mL⁻¹. No preparo dos lotes, a dois mililitros da suspensão obtida foram adicionados a 598 mL de leite desnatado estéril, suplementado com 100 mM de sacarose no caso dos lotes de *L. monocytogenes* e *E. coli*, e leite desnatado com 100 mM de trealose no lote de Salmonela. Após a homogeneização por 20 min, volumes de 1 mL foram distribuídos em 416 frascos de vidro estéreis (Schott, Brasil), distribuídos em 8 estantes. Rolhas próprias para liofilização foram posicionadas nos frascos. Os frascos foram transferidos para ultrafreezer à temperatura aproximada de -70 °C (Thermo, USA). As estantes do lote foram divididas em dois sub-lotes contendo 208 frascos. Os sub-lotes foram identificados como sub-lote 1 e sub-lote 2 e posteriormente submetidos separadamente a ciclos de liofilização a -40 °C por 24 h (K105, Liotop, Brasil). Após a liofilização, foi realizado o controle do vácuo em cada um dos frascos, com aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil). Os frascos que apresentaram vácuo foram selecionados, lacrados e estocados a -70 °C em ultrafreezer (Thermo, USA).

3.9 Procedimentos de controle dos CBR

Os controles foram realizados separadamente para cada um dos lotes.

Antes de serem submetidos aos testes de controle, as unidades dos lotes liofilizadas foram reconstituídas com 1 mL de solução salina peptonada (SSP) a 0,1 % e mantidas em repouso por 10 minutos.

Os estudos da homogeneidade, estabilidade, viabilidade, pureza, identificação fenotípica, genotípica e de tipificação molecular foram aplicados visando atender aos requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012 e as orientações da NIT-DICLA 061:2012.

3.9 1. Estudos da viabilidade, pureza, homogeneidade e estabilidade

3.9.1.1 Estudos da viabilidade e da pureza

Dez frascos, correspondentes a 2% do lote, cinco de cada sub-lote foram selecionados de forma aleatória. Cada líófilo reconstituído foi semeado por esgotamento na superfície de uma placa de ágar tripticaseína de soja (TSA) (Difco, USA) com 0,6% de extrato de levedura (Acumedia, USA). Após a incubação a 35 °C por 48 h foi verificada a pureza do crescimento, caracterizada pela presença de apenas um tipo de morfologia colonial entre as placas do mesmo lote analisado.

3.9.1.2 Teste da homogeneidade

O teste da homogeneidade foi realizado a partir da avaliação quantitativa da concentração de células dos frascos selecionados de cada lote. Foi realizado o cálculo do número de unidades do lote a serem analisados em cada um dos sub-lotes (N), através da aplicação da equação abaixo (BRITISH STANDARD, 1976):

$$N = 3\sqrt[3]{n} \qquad \text{Equação 1}$$

Onde n é o número de frascos produzidos.

Desta forma, o número de frascos calculado para análise foi de 18. No entanto, foram selecionados de forma aleatória sistemática 20 (vinte) frascos, de cada um dos sub-lotes.

Antes da análise do conteúdo dos frascos foram realizadas diluições sucessivas, a partir da homogeneização de 1 mL do líófilo reconstituído, com 9 mL de SSP a 0,1 %. Para os CBR de *Salmonella* e de *E. coli* foram realizadas três diluições sucessivas e para o CBR de *L. monocytogenes* quatro diluições. Os lotes foram analisados em duplicata, pelo método *pour-plate*, sob as mesmas condições de repetibilidade. Para a análise de cada frasco foi utilizado 0,1 mL da maior diluição preparada, homogeneizado com 10 mL de TSA contendo 0,6% de extrato de levedura. Após a solidificação do ágar foram adicionadas sobrecamadas de 5 mL de meios seletivos indicadores específicos: ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG) (Difco, USA) nas placas referentes ao CBR de *Salmonella* (KORNACKI; JOHNSON, 2001); ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA)

(Difco, USA) para os representantes do CBR de *E. coli* (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002) e ágar cromogênico para *Listeria* (HITCHINS; JINNEMANE; CHEN, 2017) para as unidades do CBR *Listeria*. As placas de VRBG e VRBA foram incubadas a 35 °C por 24 h e as de TSA com ágar cromogênico para *Listeria* a 35 °C por 48 h. Foram utilizados termômetros calibrados no controle das temperaturas. Após o período de incubação foi realizada a contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) em equipamento contador de colônias. Posteriormente os valores obtidos em UFC foram expressos em base logaritma (\log_{10}) e submetidos à avaliação estatística.

Na avaliação estatística, foram seguidas as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012. Os resultados foram plotados e submetidos à análise da variância (ANOVA) em planilha Excel, que consiste em uma ferramenta estatística para verificação de possíveis variações na composição das amostras.

Considerando os resultados dos sub-lotes, partiu-se para a avaliação da homogeneidade de cada um dos lotes. Foram então aplicados testes estatísticos adicionais, segundo orientações de Callegari-Jaques (2003). Foram estabelecidas hipóteses estatísticas (equivalência entre os lotes), a um nível de significância de $\alpha=0,05$. Primeiramente foi aplicado o “teste F”, que verifica se as variâncias entre dois grupos são equivalentes. No “teste F”, as hipóteses foram consideradas aceitas, quando os valores de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico uni-caudal}}$. Em seguida, foi utilizado o “teste t”, que avalia a diferença entre as médias de dois grupos. Da mesma forma, a hipótese do “teste t” foi aceita, quando $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico bi-caudal}}$.

O cálculo da contribuição da incerteza da homogeneidade considerou as informações obtidas na análise de variância (ANOVA) fator único. Como a “Média Quadrática entre as unidades do lote” (MQ_{entre}) dos materiais de referência, para cada lote foi maior que a “Média Quadrática dentro das unidades do lote” (MQ_{dentro}) para cada lote utilizou-se, de acordo com as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012, a equação a seguir,

$$u_{(\text{homogeneidade})} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde n é o número de replicatas realizadas no ensaio

3.9.1.3 Estudos de estabilidade

Foram realizados os estudos de estabilidade de curta e de longa duração, avaliando a manutenção da concentração de células dos CBR. As metodologias de contagem foram semelhantes às aplicadas no teste da homogeneidade (item 3.9.1.2).

O estudo de curta duração, verificou o efeito de duas temperaturas de 4 °C e de 38 °C, na concentração de células dos materiais, considerando quatro dias o tempo máximo de transporte a que os MR poderão ser submetidos no ato do fornecimento. Foi empregado o modelo isócrono (LAMBERTY; SCHIMMEL; PAUWELS, 1998), que propicia a análise de diferentes amostras em condições de repetibilidade. Assim, anteriormente ao início das análises, a cada dia, dois frascos de cada lote foram acondicionados em embalagem própria para transporte de material biológico, iniciando pelos frascos que foram incubados durante quatro dias, até a incubação de um dia. Os frascos foram identificados pelo número de dias de incubação. As condições de tempo e temperatura foram mantidas para todos os oito frascos de cada grupo. Quatro dias após a primeira incubação, todos os frascos foram analisados, sob as mesmas condições de análise, com acréscimo de dois frascos retirados da temperatura de referência (-70 °C), que representaram o tempo zero. Assim, foram totalizados dezesseis frascos de cada lote. Para o cálculo da incerteza da estabilidade de curta duração, foi considerada a condição máxima de transporte, a qual o material permaneceu estável (4°C por 4 dias).

O estudo de longa duração foi realizado durante o período de um ano, sendo baseado na verificação da estabilidade da concentração de células ao longo do tempo. As análises foram realizadas em intervalo de 15 dias, com dois frascos representantes de cada uma das temperaturas: armazenamento (-20 °C) e referência (-70 °C). O estudo a -20 °C teve como objetivo verificar a estabilidade dos MR, na temperatura de estoque utilizada pela maioria dos laboratórios, que não dispõem de *ultrafreezer*. Os frascos submetidos ao estudo da estabilidade a -20 °C foram selecionados aleatoriamente e transferidos da temperatura de referência (-70 °C) para a temperatura de armazenamento (-20 °C) após o resultado do teste da homogeneidade. Foram utilizados termômetros calibrados no controle das temperaturas.

A avaliação estatística da estabilidade foi baseada nas orientações do ABNT ISO GUIA 35:2012, que preconiza a análise de regressão linear, verificando a relação entre duas variáveis. No caso deste estudo, acompanhou-se a variação da concentração do analito em função do tempo. Foi considerada a média dos valores de cada dia de estudo, convertidos em \log_{10} .

A partir da análise de regressão em planilha Excel foram apresentados dados referentes ao intercepto (coeficiente linear), a inclinação (coeficiente angular) e aos valores dos intervalos de confiança do coeficiente angular. Com os intervalos de confiança da inclinação foi possível inferir a correlação linear entre a variável independente x e a dependente y .

$$y = a + bx \quad \text{Equação 3}$$

onde: a = intercepto (coeficiente linear) e b = inclinação (coeficiente angular)

A avaliação da estabilidade foi estabelecida, a partir do módulo do coeficiente angular, que deve apresentar valor menor que o erro do coeficiente angular (s_b) multiplicado pela probabilidade t de Student.

$$| b_1 | < s_b \times t \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

s_b = erro do coeficiente angular (desvio padrão do coeficiente angular da regressão linear);

t = t de Student.

Desta forma, quando $| b_1 | < s_b \times t$, o material avaliado é classificado como estável na temperatura estudada, sendo que o contrário $| b_1 | > s_b \times t$, classifica o material como não estável.

A contribuição da incerteza da estabilidade foi calculada a partir do desvio padrão do coeficiente angular da regressão linear, multiplicado pelo tempo de estudo, na mesma unidade.

$$u_{(\text{estabilidade})} = S_b \times t \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

s_b = erro do coeficiente angular (desvio padrão do coeficiente angular da regressão linear);

t = tempo de estudo.

3.9.2. Identificação e caracterização molecular dos CBR

As análises de identificação fenotípica, genotípica e caracterização molecular por MLST e ERIC-PCR foram realizadas por apenas um laboratório.

Para o controle de cada lote foram utilizados oito unidades de cada CBR, selecionadas aleatoriamente e retiradas da temperatura de referência de -70 °C.

Os líofilos reconstituídos foram semeados em TSA com 0,6% de extrato de levedura e incubados a 35 °C por 24 h.

Para os testes de identificação genotípica e caracterização molecular foi realizada a extração de DNA dos crescimentos obtidos, de acordo com os procedimentos do item 3.4.1.

3.9.2.1 Identificação fenotípica

As culturas em TSA com 0,6% de extrato de levedura, referentes às oito unidades dos lotes do CBR de *S. Typhimurium* e do CBR de *E. coli* foram submetidas à análise em equipamento semi-automatizado VITEK 2.0, utilizando cartão GN, juntamente com as cepas de referência: *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536, específicas para cada grupo estudado.

As culturas das oito unidades do lote CBR *L. monocytogenes* foram analisados em kit API Listeria. As cepas *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751 foram utilizadas como controle.

3.9.2.2 Identificação genotípica

Os DNA extraídos foram submetidos às metodologias de amplificação por PCR descritas no item 3.4.2.

As reações de PCR, específicas para cada grupo estudado, foram também realizadas com os DNA dos isolados selecionados para o preparo dos lotes e das cepas de referência: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* ATCC 13311; *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724, *E. coli* ATCC 10536; *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 15313 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751.

Com os resultados obtidos, foram comparados os fragmentos de banda obtidos das cepas de referência, dos isolados utilizados para o preparo de cada um dos CBR e das oito unidades analisadas de cada CBR.

3.9.2.3 Tipificação molecular pelo MLST

Os DNA foram submetidos à caracterização molecular dos sete genes conservados, específicos para cada grupo estudado pelo método do MLST descrito no item 3.5.

O perfil do isolado utilizado no preparo de cada CBR foi comparado com o perfil das oito unidades de cada CBR analisadas.

3.9.2.4 Tipificação molecular pelo ERIC-PCR

Foi empregada a metodologia da ERIC-PCR proposta por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991), com o objetivo de verificar a semelhança do perfil genotípico, entre os isolados utilizados para a produção dos CBR, as oito unidades representantes dos lotes e as cepas de referência: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA751.

Inicialmente foi realizada a verificação da especificidade da PCR das cepas de referência citadas acima com cada um dos primers: ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') separadamente.

Para o preparo da reação foram utilizados 12,5 µL de Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 2 µL de primer a 25 pmol, 5 µL de DNA e 5,5 µL de água livre DNase/RNase (BioBasic, Canada). A amplificação foi realizada em aparelho SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore), submetidas a um ciclo de: 94 °C/5 min, 45 ciclos 94 °C/1min, 45 °C/1 min, 74 °C/1 min e extensão de 74 °C/1min. Volumes de 10 µL dos amplicons foram aplicados em gel de agarose a 1,5% em tampão Borato EDTA 0,5 X (pH 8,0), juntamente com o peso molecular 100 pb (Invitrogen, USA). Os fragmentos foram marcados com o agente intercalante Gel Red™, de acordo com as instruções do fabricante, sendo visualizados e avaliados através do programa ImageQuant 300 (GE Healthcare).

O perfil de bandas obtido pela ERIC-PCR foi submetido à análise através do programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Bélgica). Foram gerados dendrogramas, a fim de facilitar a visualização do perfil de bandas, entre as amostras analisadas.

3.9.2.5 Tipificação molecular pelo RAPD

A reação da RAPD foi empregada na diferenciação de DNA de estirpes de *Salmonella* Typhimurium. Os primers: OPA1 (5' CAGGCCCTTC 3'), OPA2 (5' TGCCGAGCTG 3') e OPA3 (5' AGTCAGCCAC 3') foram testados separadamente com as cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* ATCC 13311 e com o isolado selecionado para o preparo do lote CBR de *S. Typhimurium*.

Em cada reação foram empregados 12,5 µL de Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 5 µL do primer a 3 pmol, 5 µL de DNA e 2,5 µL de água livre DNase/RNase (BioBasic, Canada). A reação de amplificação foi realizada em aparelho SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore), utilizando os seguintes parâmetros: um ciclo de 95 °C/3 min, seguidos de 45 ciclos de 94 °C/1min, 36 °C/1 min, 72 °C/2 min e extensão de 72 °C/ 7min. Volumes de 10 µL dos amplicons foram aplicados em gel de agarose a 1,5% em tampão Borato EDTA 0,5 X (pH 8,0), marcados com o agente intercalante Gel Red™, juntamente com o peso molecular 100 pb (Invitrogen, USA) e submetidos a eletroforese a 60 V por aproximadamente 2 horas. Os fragmentos foram visualizados e avaliados através do programa ImageQuant 300 (GE Healthcare).

Os perfil de bandas foram submetidos à análise através do programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Bélgica). Foram gerados dendrogramas, a fim de facilitar a visualização do perfil de bandas, entre as amostras analisadas.

3.10 Estudo colaborativo para o acompanhamento do uso dos CBR

Após a finalização da etapa de controle dos CBR, foi iniciado um estudo de acompanhamento do uso dos materiais, com a participação de dois Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN). O estudo teve como objetivo verificar o comportamento dos CBR, como controle interno, na rotina de laboratórios que realizam ensaios de controle microbiológico de alimentos.

Foram enviados dois frascos de cada CBR para os participantes, juntamente com formulário com orientações relativas à utilização dos materiais.

3.11 Protocolos de amplificação por PCR do Gene *Uida*

Após os resultados do estudo colaborativo de *E. coli*, foi aplicada a metodologia proposta por Bej et al (1991) com o desenho dos primers modificado por Heijnen e Medema (2006), descritos na quadro 3. A reação foi realizada com uma unidade do MR, ao lado das cepas de referência *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536 utilizadas como controle positivo e das cepas *E. aerogenes* ATCC 13048 e *K. pneumoniae* ATCC 13883 como controle negativo da reação.

Quadro 3 – Sequência de prime do gene *uidA*

Primer	Sequência
UAL1939b	5'-ATGGAATTCGCCGATTTTGC-3'
UAL2105b	5'-ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3'

Fonte: Do autor, 2015.

3.12 Caracterização molecular adicional dos cbr pelo sequenciamento dos genes espécie específicos

Para a caracterização molecular adicional foram aplicados os protocolos de amplificação da PCR, descritos no item 3.4.2. Para as reações de PCR foi utilizada uma unidade selecionada do CBR de *S. Typhimurium*, no qual foi realizada a reação da PCR do gene STM 449. Uma unidade do CBR de *E. coli* foi submetida a reação de amplificação do gene *uspA*. Da mesma forma, em uma unidade do lote de CBR de *L. monocytogenes* foi realizada a amplificação do gene *inlAB*.

Os produtos da PCR foram purificados, sequenciados segundo Sanger, pela Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC, no Analisador Automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, USA), de acordo com o protocolo de Otto et al (2008).

A partir da utilização do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), foi comparada a sequência dos nucleotídeos obtidas, para cada CBR, com as sequências do *GenBank database* e calculada a significância estatística das correlações.

3.13 Certificação dos CBR

Para a certificação dos CBR foram adotados os procedimentos de certificação estabelecidos na ABNT ISO GUIA 35:2012.

3.13.1 Certificação dos lotes CBR *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

A certificação dos lotes CBR de *S. Typhimurium* e de *L. monocytogenes*, baseada somente nas propriedades qualitativas, foi realizada considerando os valores de referência obtidos e o grau de confiança das metodologias aplicadas nos controles de caracterização dos CBR. A abordagem aplicada na caracterização qualitativa foi a da utilização de diferentes métodos por um único laboratório.

3.13.2 Certificação do lote CBR *E. coli*

Até esse ponto, a certificação do CBR de *E. coli* foi realizada com os resultados das análises qualitativas, com abordagem semelhante à aplicada aos

outros lotes. No entanto, além do estudo qualitativo foi aplicado ao lote do CBR de *E. coli* a certificação da propriedade quantitativa. Para isso, foram utilizadas as incertezas combinadas, geradas nos testes da homogeneidade, estabilidade e na caracterização quantitativa.

Para o cálculo da incerteza combinada (u) foi empregada a fórmula:

$$U_{(MRC)} = \sqrt{u_{homogeneidade}^2 + u_{estabilidade\ de\ longa\ duração}^2 + u_{estabilidade\ de\ curta\ duração}^2 + u_{caracterização}^2}$$

Equação 6

Onde

u^2 : incerteza;

A incerteza expandida (U) foi determinada considerando um fator de abrangência de aproximadamente 95%, com $k = 2$.

$$U_{(MRC)} = k \times u_{(MRC)}$$

Equação 7

Onde:

k : fator de abrangência

$u_{(MRC)}$: incerteza combinada

3.13.2.1 Cálculo da contribuição incerteza da caracterização

A contribuição da incerteza da caracterização (u_{car}) foi obtida a partir de um estudo interlaboratorial, com a participação de dois laboratórios do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ (Setor de Alimentos e Setor de Produtos não Estéreis). Cada laboratório recebeu três amostras do CBR de *E. coli* e foi orientado a realizar a análise quantitativa de cada amostra por três vezes, semeando alíquotas das repetições em duplicata. Para a quantificação dos itens, foi empregada a metodologia de contagem em placas utilizada nos controles da homogeneidade e estabilidade.

Foi calculada a incerteza padrão, isto é, desvio padrão por raiz de n .

Assim, a incerteza da caracterização quantitativa foi calculada pela fórmula:

$$u_{\text{caracterização}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Equação 8

Onde:

S: desvio padrão de todos os resultados;

n: número de resultados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e tipificação dos isolados

4.1.1 Identificação Fenotípica

A análise fenotípica pelo sistema ViteK 2 resultou na confirmação da identidade dos isolados e das cepas de referência de *Salmonella* e de *E. coli*. Os resultados referentes aos isolados e as cepas de referência de *S. Typhimurium* e de *E. coli* apresentaram porcentagem de homologia de 96 a 99%, com nível de confiança de “excelente identificação”, gerada pelo equipamento para todas as análises.

A análise fenotípica de *L. monocytogenes* foi realizada a partir da análise pelo kit Api. A identidade dos dez isolados avaliados como *L. monocytogenes* foi confirmada, todos com o mesmo código gerado pelo Kit: 6.5.1.0, com nível de confiança de 98,9%. Os testes com as cepas de referência de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*, levaram à correta identificação das diferentes espécies. Os resultados do teste da hemólise auxiliaram na identificação da espécie *L. monocytogenes*, com todos os isolados apresentando reação de fraca hemólise, característico da espécie.

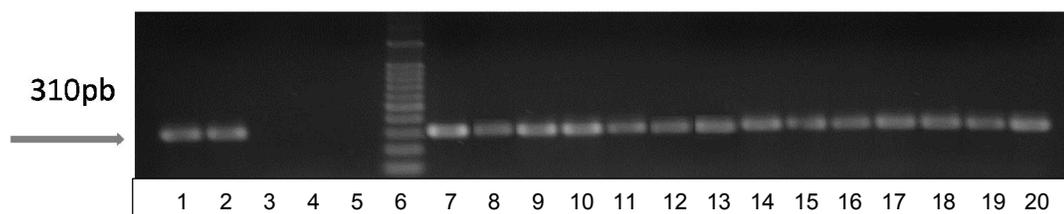
Todos isolados de *L. monocytogenes* enviados para sorotipificação foram classificados como sorotipo 1/2a. Os dados encontrados evidenciaram a prevalência do sorotipo 1/2a entre os isolados obtidos de carne de frangos. Os resultados se alinham com os resultados de Vallim et al (2015), que ao avaliarem 2.248 estirpes da referida espécie, obtidos de alimentos cárneos no Brasil, entre 1990 a 2012 indicaram o sorotipo 1/2a como o mais prevalente, seguido dos sorotipos 1/2b e 4b.

4.1.2 Identificação Genotípica

A identificação genotípica dos isolados avaliados e das cepas de referência foi realizada por PCR convencional com genes espécie específicos. Os resultados apresentaram boa resolução, com os isolados de cada grupo de bactérias estudadas exibindo o mesmo perfil de bandas. A sensibilidade e especificidade das reações foram verificadas a partir da utilização de cepas de referência.

Os isolados de *S. Typhimurium* tiveram sua identificação confirmada pela PCR com alvo no gene *STM 4497*, gerando fragmentos de 310 pb (Figura 1). Bons resultados foram também obtidos por outros autores ao utilizarem a metodologia de Kim et al (2006) (SHANMUGASUNDARAM et al, 2009, PARK et al, 2009, PARK; RICKE, 2014).

Figura 1- Identificação genotípica de *Salmonella Typhimurium* com alvo no gene *STM 4497*.

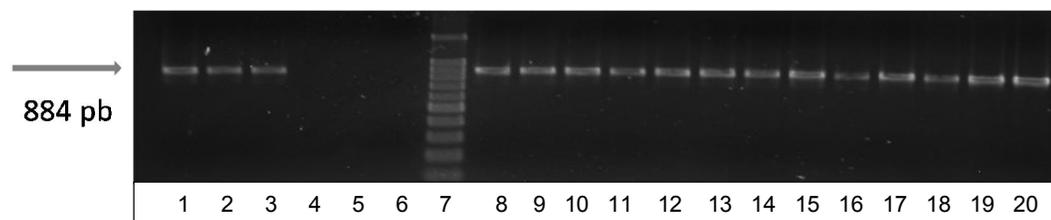


Fonte: Do autor, 2015.

Linha 1: *S. Typhimurium* ATCC 13311; linha 2: *S. Typhimurium* ATCC 14028; linha 3: *S. Arizonae* ATCC 13314; linha 4: *S. Cholerasuis* ATCC 10708; linha 5: *S. Enteritidis* ATCC 13076; linha 6: peso molecular de 100 pb; linhas 7 a 20: isolados SALM 09 ao 22.

A identificação dos isolados de *E. coli*, foi verificada pela amplificação do gene *uspA*, resultando na produção de fragmentos de 884 pb (Figura 2). Diversos autores também evidenciaram boa resolução no emprego da metodologia descrita por Chen e Griffiths (1998) (OSEK, 2001, ANASTASI et al, 2010, GODAMBE; BANDEKAR; SHASHIDHAR, 2017).

Figura 2 - Identificação genotípica de *Escherichia coli* com amplificação do gene *uspA*.

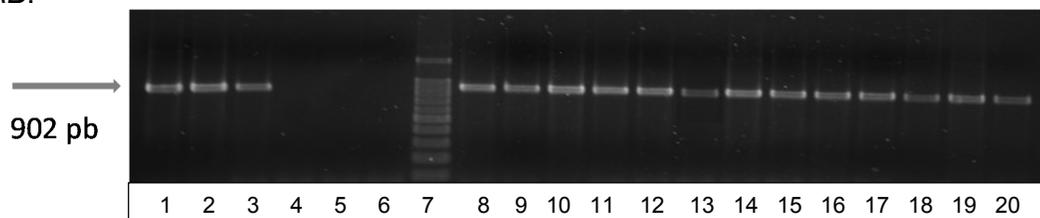


Fonte: Do autor, 2015.

Linha 1: *E. coli* ATCC 25922; linha 2: *E. coli* ATCC 23724; linha 3: *E. coli* ATCC 10536; linha 4: *S. Typhimurium* ATCC 14028; linha 5: *K. pneumoniae* ATCC 13883; linha 6: *E. aerogenes* ATCC 13048; linha 7: peso molecular de 100 pb; linhas 8 a 20: isolados EC 49, 59, 61, 81, 84, 88, 90, 92, 96, 98, 99, 102 e 139.

A confirmação dos isolados de *L. monocytogenes* foi realizada com alvo no gene *inlAB*, com fragmentos de 902 pb (Figura 3). Resultados satisfatórios foram similarmemente descritos por outros autores (WU et al, 2015, LEAL et al, 2015), ao utilizarem a metodologia de Jung et al (2003).

Figura 3 - Identificação genotípica de *Listeria monocytogenes* com alvo nos genes *inlAB*.



Fonte: Do autor, 2015.

Linha 1: *L. monocytogenes* ATCC 15313; linha 2: *L. monocytogenes* ATCC 7644; linha 3: *L. monocytogenes* ATCC BAA 751; linha 4: *L. innocua* ATCC 33090; linha 5: *L. ivanovii* ATCC 19119; linha 6: *L. seeligeri* ATCC 35967; linha 7: peso molecular de 100 pb; linhas 8 a 20: isolados LIST 09 ao 22.

4.1.3 Tipificação Molecular pelo Método MLST

A análise por MLST dos isolados de *S. Typhimurium* resultou na identificação de quatro tipos sequenciais: ST 19 (10 estirpes), ST 50 (2), ST 313 (1), ST 679 (1), distribuídos em três *Burst Group* (eBG), representados por clusters relacionados. A cepa de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi agrupada no ST 19 e a *S. Typhimurium* ATCC 13311 no ST 2066.

A Tabela 1, define os perfis de alelos das estirpes de *Salmonella* avaliadas pelo MLST, com a indicação dos ST e dos eBG.

O eBG 1 congregou 12 (75%) das estirpes avaliadas: o ST 19, o ST 313 e o ST 2066, que compartilham pelo menos cinco alelos iguais entre si. Um isolado com indicação de um possível novo alelo no gene *sucA*, e conseqüentemente a apresentação de um novo ST, também apontado como pertencente ao eBG 1 foi submetido ao banco de dados para designação de novo alelo. O ST 50 foi associado ao eBG 14 e o ST 679 ao eBG 155.

A cepa de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentou o mesmo perfil de ST de nove isolados avaliados. A cepa *S. Typhimurium* ATCC 13311 apresentou um ST distinto de todas as estirpes avaliadas, contudo foi classificada como pertencente ao eBG 1.

Tabela 1 - Perfis de alelos das estirpes de *Salmonella* Typhimurium avaliadas pelo MLST.

Estirpes	Perfil de Alelos							ST	eBG
	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA		
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	10	456	12	9	70	9	2	2066	1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 09	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 10	5	21	18	9	6	12	17	50	14
SALM 11	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 12	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 13	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 14	46	122	3	18	6	19	1	679	155
SALM 15	5	21	18	9	6	12	17	50	14
SALM 16	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 17	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 18	10	7	12	9	5	PNA	2	A	1
SALM 19	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 20	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 21	10	7	12	9	5	9	2	19	1
SALM 22	10	7	12	9	122	9	2	313	1

Fonte: Do autor, 2015.

ST- Tipo sequencial, eBG- *Burst Group*; PNA- possível novo alelo; A- em análise, possível novo ST.

O banco de dados *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) para *Salmonella*, *Scheme Achtman 7* Gene MLST consultado em 04/12/2017 apresentava 122.628 depósitos e 4.456 diferentes ST. O ST 19 é descrito como o principal ST do eBG 1 (ACHTMAN et al, 2012), que abriga em quase sua totalidade representantes do sorovar Typhimurium. O ST 19 é um dos ST mais comuns no banco de dados de *Salmonella*, representado por 13.726 depósitos. São agrupadas neste ST estirpes virulentas de *S. Typhimurium*, frequentemente associada à multirresistência à drogas antimicrobianas. Cooke et al (2008) avaliaram treze estirpes de *S. Typhimurium* DT104 e as associaram ao ST 19.

O *Enterobase* conta com 31 depósitos de ST 19 de origem brasileira, sendo a maioria proveniente de fontes animais e humanas, com isolados associados à gastroenterite clássica.

Os dados do presente estudo indicam uma alta incidência do ST 19, representado por nove (64%) dos 14 isolados avaliados e pela cepa de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028. A prevalência do ST 19 entre as estirpes de *S. Typhimurium* no Brasil foi também descrita por Almeida et al (2017). Os autores

utilizaram o MLST na tipificação de 88 isolados de *S. Typhimurium*, obtidos no período de 1983 a 2013, de fontes humanas e de alimentos de diferentes estados do país, e identificaram 76 isolados (86,4%) como ST 19.

O ST 19 é conhecido como o ST de *S. Typhimurium* mais prevalente na maioria das regiões do mundo (ACHTMAN et al, 2012). Pode-se destacar algumas exceções, como na China, onde o ST 34 é o mais prevalente, seguido pelo ST 19 (SUN et al, 2014) e no sub-Saharan da África onde o ST 313 é o mais encontrado, acompanhado do ST 19 (KINGSLEY et al, 2009). Ashton et al (2016) indicaram a predominância dos ST 19 e 34 de *S. Typhimurium* ao avaliarem 6.687 isolados de *Salmonella* provenientes da Inglaterra.

Os resultados deste estudo evidenciaram também a presença de uma estirpe proveniente de um surto na região Sul do país ocorrido no ano de 2014, que foi agrupado no ST 313 do eBG 1. *S. Typhimurium* ST 313 consiste em uma estirpe endêmica em alguns países do continente africano, multirresistente à drogas antimicrobianas, com grande potencial invasivo e taxas de mortalidade ultrapassando 25% (KINGSLEY et al, 2009). Similarmente a este trabalho, Almeida et al (2017) descreveram a identificação de nove estirpes do ST 313 entre 88 isolados de *S. Typhimurium* isoladas no Brasil entre 1989 a 2003 de fonte humana e de alimentos. As estirpes do referido trabalho foram submetidas a avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e apenas uma apresentou resistência à ampicilina.

O banco de dados apresenta 2.383 depósitos do ST 313, com apenas 1 depósito brasileiro, de origem humana, realizado em 2011.

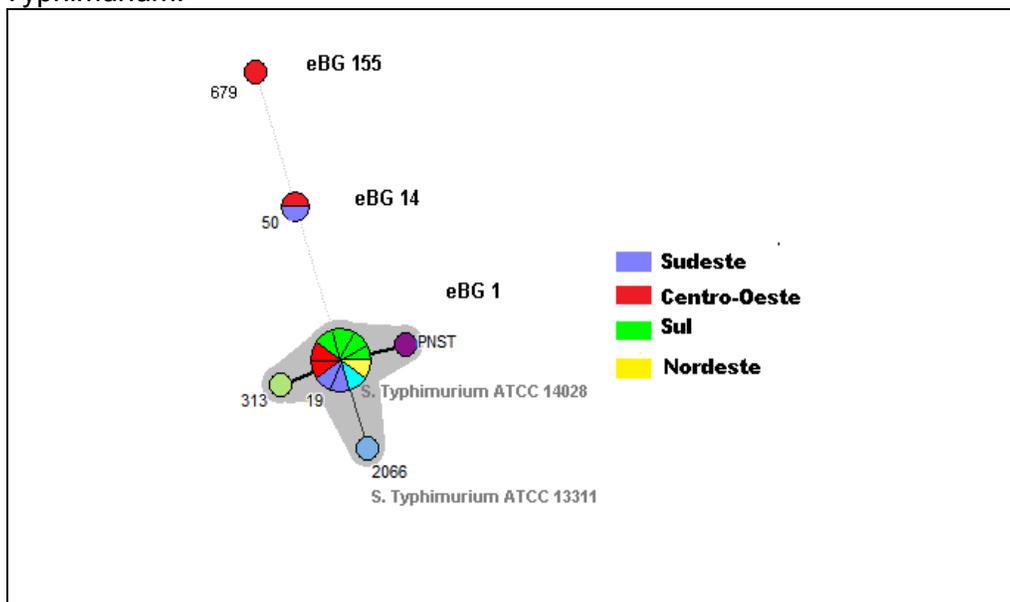
Com relação aos demais ST obtidos neste estudo, o banco de dados *Enterobase* apresenta 886 depósitos para o ST 50, com nove depósitos brasileiros de isolados humanos e animais (marisco e gado). Para o ST 679, existem 33 isolados de fonte humana, nenhum brasileiro, sendo a grande maioria originária da América do Norte. Já para o ST 2066, referente à cepa *S. Typhimurium* ATCC 13311, existem nove depósitos de origem humana e ambiental, nenhum proveniente do Brasil.

A Figura 4 apresenta o *Minimum spanning tree* (MST) dos ST de *S. Typhimurium* encontrados. O MST aponta os ST 19, 313, 2066 e um ST ainda não definido associados ao eBG 1, por possuírem 6 alelos em comum. A figura aponta a relação filogenética distante entre os ST do eBG 1 com o ST 50 (eBG 14), que possuem apenas um alelo semelhante. Assim como a relação distanciada entre o ST 50 (eBG 14) com o ST 679 (eBG 155), da mesma forma, com apenas um alelo

em comum. O MST ilustra a dispersão do ST 19 em quatro regiões do país, indicando ser o clone de *S. Typhimurium* de maior circulação. A partir da avaliação da figura, pode-se sugerir a maior diversidade de ST de *S. Typhimurium*, em curso nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país.

Considerando *Salmonella*, o principal agente de surtos de DTA no Brasil (BRASIL, 2016), os resultados deste estudo poderão contribuir para o estudo da epidemiologia das estirpes de *S. Typhimurium* no território brasileiro. Outras avaliações envolvendo maior número de isolados, de diferentes fontes, obtidos em diferentes períodos, poderão auxiliar na elucidação e entendimento das características epidemiológicas da *S. Typhimurium* no Brasil.

Figura 4 - *Minimum spaning tree* (MST) dos ST das estirpes de *Salmonella Typhimurium*.



Fonte: Do autor, 2015.

A elaboração da árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA* concatenados. Os círculos indicam o ST específico e a variação do tamanho dos círculos, apontam o número de isolados em cada ST. As cores dos círculos representam quatro regiões do Brasil, como descrito na legenda. As linhas grossas sólidas que ligam os ST, assinalam diferenças de um alelo, a linha de largura intermediária diferença de dois alelos e as linhas finas diferença de 6 alelos. O halo que circula o ST 19, ST 313, ST 2066 e PNST assinala a formação do complexo clonal eBG 1. A relação entre os ST foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6).

A partir da avaliação das estirpes de *E. coli* pelo MLST, foram determinados seis ST: ST 160, 638, 657, 5442, 5523, 6736. O ST 638, relativo à cepa de referência *E. coli* ATCC 25922, foi o único associado a um CC. Para as demais estirpes, foram identificados cinco possíveis novos alelos, dentre eles, do isolado EC

96 no gene *fumC*, do isolado EC 59 no gene *gyrB*, do isolado EC 61 do gene *mdh* e do isolado EC 139 dos genes *gyrB* e *fumC*. Foram detectados também seis possíveis novos ST, entre os isolados EC 49, 81, 88, 90, 92 e a cepa *E. coli* ATCC 10536. Todos já encaminhados ao banco de dados para designação de possíveis novos alelos e ST. Os perfis de alelos dos isolados de *E. coli* avaliados pelo MLST encontram-se descritos na Tabela 2.

Os resultados encontrados sugerem a ocorrência de uma grande heterogeneidade entre os isolados de *E. coli*. A diversidade entre representantes da espécie tem sido descrita por outros autores como Doumith et al (2015) que ao analisarem 318 sequências de genomas de *E. coli* depositados no banco de dados *GenBank* identificaram 130 diferentes ST. Em outro estudo, os autores avaliaram 448 isolados de *E. coli* de fontes humanas, ambientais e de alimentos na Espanha e detectaram 177 ST (OJER-USOZ; GONZÁLEZ; VITAS, 2017). Os dois trabalhos obtiveram a média de apenas 2,5 isolados para cada ST, mostrando a diversidade entre as estirpes avaliadas.

Tabela 2 - Perfis de alelos das estirpes de *Escherichia coli* avaliadas pelo MLST.

Estirpe	Perfil de Alelos							ST	CC
	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	76	24	9	13	17	11	25	638	73
<i>E. coli</i> ATCC 23724	468	11	4	8	8	8	2	5442	ND
<i>E. coli</i> ATCC 10536	502	4	4	16	24	8	14	ND	ND
EC 49	575	4	5	26	7	13	6	ND	ND
EC 59	502	11	PNA	8	8	8	325	A	A
EC 61	92	231	87	96	PNA	58	2	A	A
EC 81	511	30	15	18	43	8	7	ND	ND
EC 84	6	6	15	16	11	26	6	160	ND
EC 88	502	29	3	1	11	62	6	ND	ND
EC 90	502	29	12	1	9	8	7	ND	ND
EC 92	623	27	4	8	8	8	164	ND	ND
EC 96	511	PNA	3	1	24	23	7	A	A
EC 98	12	192	8	254	27	1	2	6736	ND
EC 99	64	7	1	561	8	8	6	5523	ND
EC 102	20	45	41	43	5	50	46	657	ND
EC 139	18	PNA	PNA	6	4	5	4	A	A

Fonte: Do autor, 2015.

ST- Tipo sequencial, CC- complexo Clonal; PNA- possível novo alelo; ND-não definido pelo banco de dados; A- em análise.

O banco de dados *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) para *Escherichia/Shigella* MLST Scheme Achtman em consulta realizada em 04/12/2017, apresentava 71.425 depósitos de isolados e 7.953 ST. O banco conta com 2

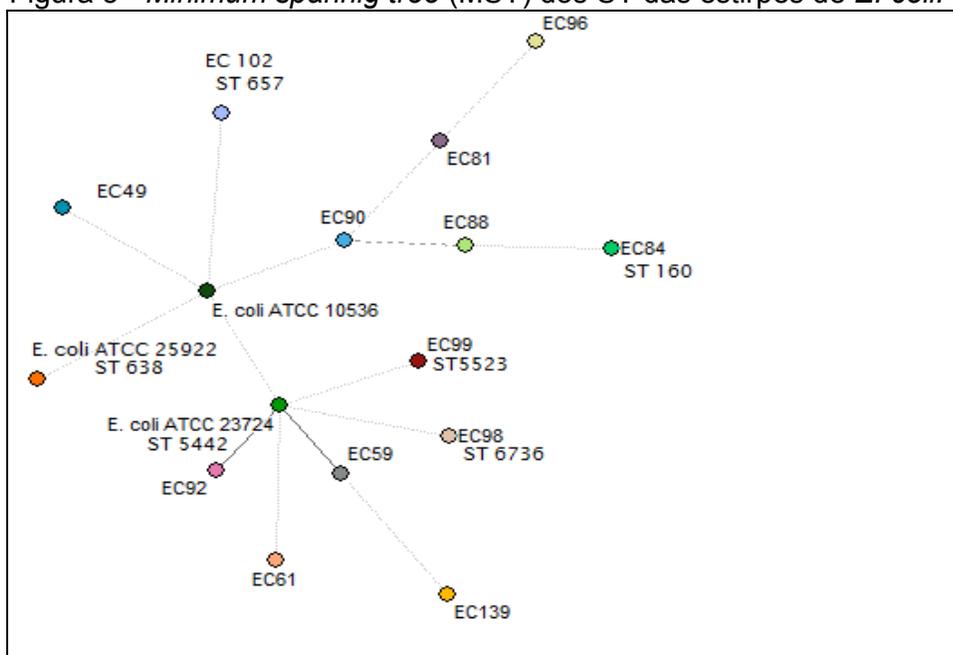
depósitos do ST 160, um isolado de fonte humana associado a quadro de diarreia, originário de Ghana e um de fonte desconhecida da Austrália. Dois depósitos do ST 6736 estão sem informações sobre fonte e origem. Conta também com nove depósitos do ST 5523, quatro de fontes humanas enviados pela Dinamarca e Japão, e seis sem informações de fontes e origens. Com relação ao ST 657 foram encontrados 23 depósitos, quatro de fontes humanas, três de animais, um ambiental e 15 de fontes desconhecidas originárias da Alemanha, Estados Unidos, Inglaterra e Japão, sendo que um dos depósitos realizado pela Alemanha apresenta a classificação de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

O presente estudo indicou, a partir da consulta ao *EnteroBase*, que as estirpes avaliadas, isoladas de amostras de hortaliças, foram agrupadas em ST, onde foram também congregadas outras estirpes associadas a quadros de enfermidades em humanos, podendo-se sugerir a possibilidade de potenciais de patogenicidade entre os representantes do grupo.

A Figura 5 apresenta o *Minimum spanning tree* (MST) dos ST de *E. coli* definidos neste estudo. Observa-se no gráfico o arranjo de 16 círculos, cada um abrigando uma única estirpe. Os isolados que mais se aproximaram, em numeração de alelos, às cepas de referência foram o EC 59 e o EC 92, apresentando quatro alelos em comum com a cepa *E. coli* ATCC 23724. Na comparação entre os isolados, a maior proximidade foi identificada entre o EC 88 e o EC 90 e entre o EC 59 e o EC 92, ambas as duplas com apenas três alelos em comum. O MST ilustra a diversidade genética entre as estirpes avaliadas.

A variedade genética dentro da espécie *E. coli* reflete a plasticidade genômica do grupo, resultante das altas taxas de recombinação gênica (TENAILLON et al, 2010, KÖHLER; DOBRINDT, 2011).

Figura 5 - *Minimum spanning tree* (MST) dos ST das estirpes de *E. coli*.



Fonte: Do autor, 2015.

A elaboração da árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *pura* e *recA*. Os círculos de diferentes cores indicam os distintos ST. As linhas grossas sólidas que ligam os ST assinalam diferença de três alelos, a linha pontilhada diferença de quatro alelos e as linhas finas diferença de 6 ou 7 alelos. A relação entre os ST foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6).

Na metodologia do MLST de *Listeria*, todas as estirpes foram agrupadas em quatro ST, revelando alta clonalidade. Oito isolados, LIST 9, 10, 14, 16, 17, 18, 19 e 20, apresentaram o mesmo perfil nos sete genes sendo associados ao ST 155 (CC 155). Dois isolados foram classificados como ST 11 (CC 11), dois outros como ST 121 (CC 121) e um como ST 8 (CC 8). As cepas de referência de *L. monocytogenes* utilizadas exibiram perfis diferenciados, sendo distribuídas em três tipos sequenciais distintos: *L. monocytogenes* ATCC BAA751 como ST 3 (CC 3), *L. monocytogenes* ATCC 15313 como ST 107 (CC 7) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 como ST 122 (CC 9). Todos os CC definidos agruparam somente um ST de cada cepa de referência utilizada. A Tabela 3 apresenta os perfis de alelos definidos pelo MLST para os isolados de *L. monocytogenes* avaliados.

Tabela 3 - Perfis de alelos das estirpes de *L. monocytogenes* avaliadas pelo MLST.

Estirpe	Perfil de Alelos							ST	CC
	abcZ	bglA	cat	dapE	dat	ldh	lhk		
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	5	8	5	7	6	41	1	107	7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	6	5	6	4	1	62	1	122	9
<i>L. monocytogenes</i> ATCC BAA 751	4	4	4	3	2	1	5	3	3
LIST 09	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 10	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 11	5	6	2	9	5	3	1	8	8
LIST 12	7	6	10	6	1	2	1	11	11
LIST 13	7	6	10	6	1	2	1	11	11
LIST 14	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 15	7	6	8	8	6	37	1	121	121
LIST 16	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 17	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 18	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 19	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 20	7	10	16	7	5	2	1	155	155
LIST 21	7	6	8	8	6	37	1	121	121

Fonte: Do autor, 2015.

ST- Tipo sequencial, CC- complexo Clonal.

A consulta realizada em 30/11/17 no banco de dados *Institute Pasteur MLST and Whole Genome database* _ *L. monocytogenes* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/>) Indicou um total de 3.333 depósitos, com 1.352 ST. Com relação aos ST determinados neste estudo, o banco de dados fornece as seguintes informações: o ST 121 é descrito como o sexto ST mais frequente do banco e conta com 97 depósitos. O ST 155 o oitavo em frequência, com 72 depósitos. O ST 8 é classificado na décima sexta posição com 38 isolados e o ST 11 na vigésima nona posição, com 17 depósitos. Na lista do banco de dados, de todos os ST citados, são encontradas informações sobre depósitos de isolados provenientes de variadas fontes, incluindo alimentar, ambiental, animal e humana. Um destaque para o ST 8, que de 38 depósitos, 17 foram provenientes de fontes humanas, relacionados a quadros de bacteremia, meningite e infecções materno-fetais. Segundo as informações do banco de dados, os isolados dos ST relatados foram provenientes dos cinco continentes, exceto o ST 11 cujos 17 depósitos foram originários da América do Norte e da Europa.

Os resultados dos perfis moleculares encontrados neste estudo, apesar de terem sido referentes a um pequeno número de amostras obtidas de frango *in natura*, indicaram a incidência dos ST 155 (61,5% dos isolados), ST 121 (15,3%), ST

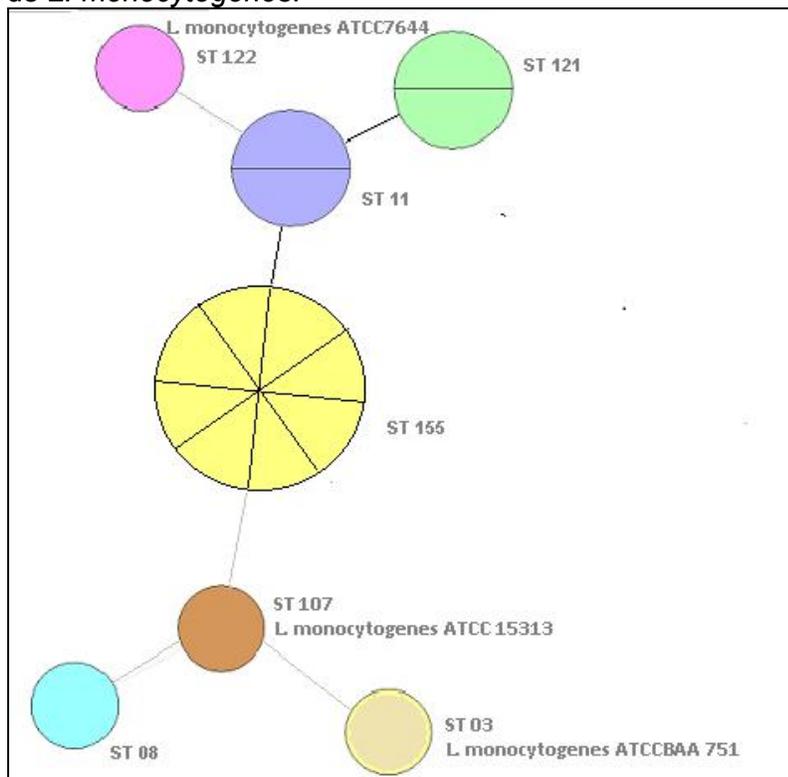
11 (15,3%) e ST 8 (7,6%). Todos esses ST são classificados como pertencentes à Linhagem II de *L. monocytogenes*, que agrupa, em sua maioria, os sorotipos 1/2a e 1/2c, importantes agentes de listeriose no mundo. Pode-se então estimar que os isolados obtidos neste estudo, classificados como sorotipos 1/2a e associados a um ST que agrupa estirpes isoladas de quadros de listeriose, podem também apresentar potenciais de patogenicidades para desencadear a infecção.

Ao compararmos os dados obtidos pelo MLST neste estudo, com dados de outros países, podemos perceber que alguns ST, como ST 155, ST 121 e ST 8 são clonais em outras regiões do mundo. Na China, um estudo com 212 estirpes isoladas de alimentos, no período de 2000 a 2008, identificou a seguinte incidência de ST: ST 9 (29,1%), ST 8 (10,7%), ST 87 (9,2%), ST 121 (6,1%) e ST 155 (3,3%) (WANG et al, 2012). Na Austrália, Jenninson et al (2017) avaliaram 224 isolados de *L. monocytogenes*, obtidos entre 1931 a 2015, de fontes humanas, animais, ambientais e de alimentos e classificaram como mais comuns o ST 1, ST 3, ST 204, ST 155, ST 9 e ST 121. Em uma avaliação de 387 isolados de casos de listeriose na Dinamarca entre 2000 e 2012, os ST identificados como mais comuns foram: o ST 8 (121 casos), ST 2 (52), ST 6 (48), ST 1 (36), ST 9 (22) e ST 155 (27) (JENSEN et al, 2016).

A Figura 6 apresenta o *Minimum spanig tree* (MST) dos ST de *L. monocytogenes* identificados neste estudo. A elaboração da árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *ldh*, *dat* e *lhkA*.

Apesar do MST esboçar a presença do clone ST 155, indica também uma heterogeneidade entre os isolados estudados. O gráfico ilustra uma relação de distanciamento evolutivo entre os ST 155 e ST 11, assim como entre o ST 11 e ST 121, que compartilham somente três alelos em comum. Aponta também uma fraca relação de proximidade evolutiva entre o ST 107 associado a cepa *L. monocytogenes* ATCC 15313, com os ST 155 e ST 8, com apenas dois alelos em comum. Da mesma forma, ST 122 que abriga a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 com o ST 11, por possuírem somente dois alelos semelhantes.

Figura 6 - *Minimum spanning tree* (MST) dos ST das estirpes de *L. monocytogenes*.



Fonte: Do autor, 2015.

Os círculos indicam o ST específico e a variação do tamanho dos círculos, apontam o número de isolados em cada ST. As linhas mais escuras que ligam os ST indicam diferenças de 4 alelos e as linhas mais finas diferenças de 5 a 7 alelos. A relação entre os ST foi determinada pela análise com BioNumerics (BioNumerics 6.6).

4.1.4 Tipificação Proteômica

Os resultados obtidos na metodologia do MALDI-TOF foram analisados pelo software *Saramis*, que atribuiu *scores* de qualidade, dentre eles o nível de confiança, descrito em porcentagem e um *datacount* estimado, que representa o número de picos do espectro de proteínas. Na identificação das estirpes pelo MALDI-TOF os resultados com *scores* de qualidade acima de 85% e *datacount* na faixa de 110 a 200 proporcionaram identificação como espécie ou sub-espécie. Resultados abaixo dos valores descritos indicaram identificação somente até gênero.

Assim, no total das 38 estirpes de *Salmonella* e de *E. coli* analisadas, todas foram identificadas somente até o gênero e 33 (86,8%) como espécie. No caso das estirpes de *Salmonella*, a identificação obtida foi a de sub-espécie *S. enterica* spp *enterica* para a grande maioria das estirpes, com exceção dos isolados SALM 10,

11, 12 e 22 e da cepa de referência *S. Arizonae* ATCC 13314, que foram identificadas somente até o gênero. No caso da *E. coli* todas as estirpes foram corretamente identificadas como *E. coli*. Outros autores relataram a identificação de representantes da família Enterobacteriaceae por MALDI-TOF: Richter et al (2013) avaliaram 965 isolados de representantes da família Enterobacteriaceae e obtiveram resultados de 97% e 84%, para identificação a nível de gênero e espécie, respectivamente; Van Veen, Claas e Kuijper (2010) ao analisarem 89 isolados da família Enterobacteriaceae identificaram 100% como gênero e 86 (96,6%) como espécie.

Com relação às estirpes de *Listeria*, os isolados LIST 16 e 17 e as cepas de referência: *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. seeligeri* ATCC 35967 e *L. innocua* ATCC 33090 geraram identificação somente até gênero, diferentemente dos demais isolados e das cepas de referência de *L. monocytogenes* (ATCC 7644, ATCC 15313 e ATCC BAA751) e da cepa *L. grayi* ATCC 25401, identificados como espécie. Alguns autores ao avaliarem o desempenho do MALDI-TOF MS com espécies do gênero *Listeria* evidenciaram que uma grande parcela dos isolados foram identificados somente até gênero, excetuando-se a espécie *L. grayi*, comumente identificada como espécie (RYCHERT et al, 2013, FARFOUR et al, 2012). Hsueh et al (2014) analisaram 139 isolados da espécie *L. monocytogenes*, obtendo um score de 90% na identificação no nível de espécie. Segundo Farfour et al (2012), a dificuldade de diferenciação entre as espécies de *Listeria* ocorre pelo fato das diferentes espécies apresentarem espectros de proteínas muito semelhantes, o que não ocorre com a *L. grayi*, por se tratar de uma espécie evolutivamente distante das outras espécies.

Com os resultados obtidos na análise do MALDI-TOF foram gerados espectros de massas *fingerprinting* entre os isolados e as cepas de referência da mesma espécie. Os resultados foram agrupados em *SuperSpectras*, com informações sobre proteínas conservadas entre cada espécie, identificadas numericamente e representadas por suas relações massa/carga (m/z) (*supermass*). Os *SuperSpectras* obtidos estão representados no Anexo A, com informações de massa/carga variando de 3.000 a 19.982 m/z .

Com os espectros de massa obtidos, foram gerados dendrogramas (Figuras 7, 8 e 9) que agruparam as estirpes, de acordo com a proximidade dos perfis proteômicos. A partir da visualização dos dendrogramas foram destacados os

isolados com os perfis mais próximos a uma das cepas de referência da mesma espécie utilizada, que são consideradas como materiais de referência para controle interno de ensaios microbiológicos. Na parte superior dos *SuperSpectras* são listadas as numerações dos isolados e das cepas de referência da mesma espécie relacionadas nos dendrogramas.

A relação da massa/carga comum entre o isolado selecionado e a cepa de referência encontra-se sinalizada em cada um dos *SuperSpectra* (Anexo A). No *SuperSpectra* relacionado às estirpes de *Salmonella*, o isolado SALM 16 apresentou, de um total de 288 espectros avaliados, 66 picos em comuns com a cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028. Do *SuperSpectra* de *E. coli* de um total de 249 espectros, o isolado EC 84 exibiu 87 picos similares com a *E. coli* ATCC 25922. Para as estirpes de *L. monocytogenes*, o isolado LIST 12 apresentou de um total de 298 espectros, 68 em comum com a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.

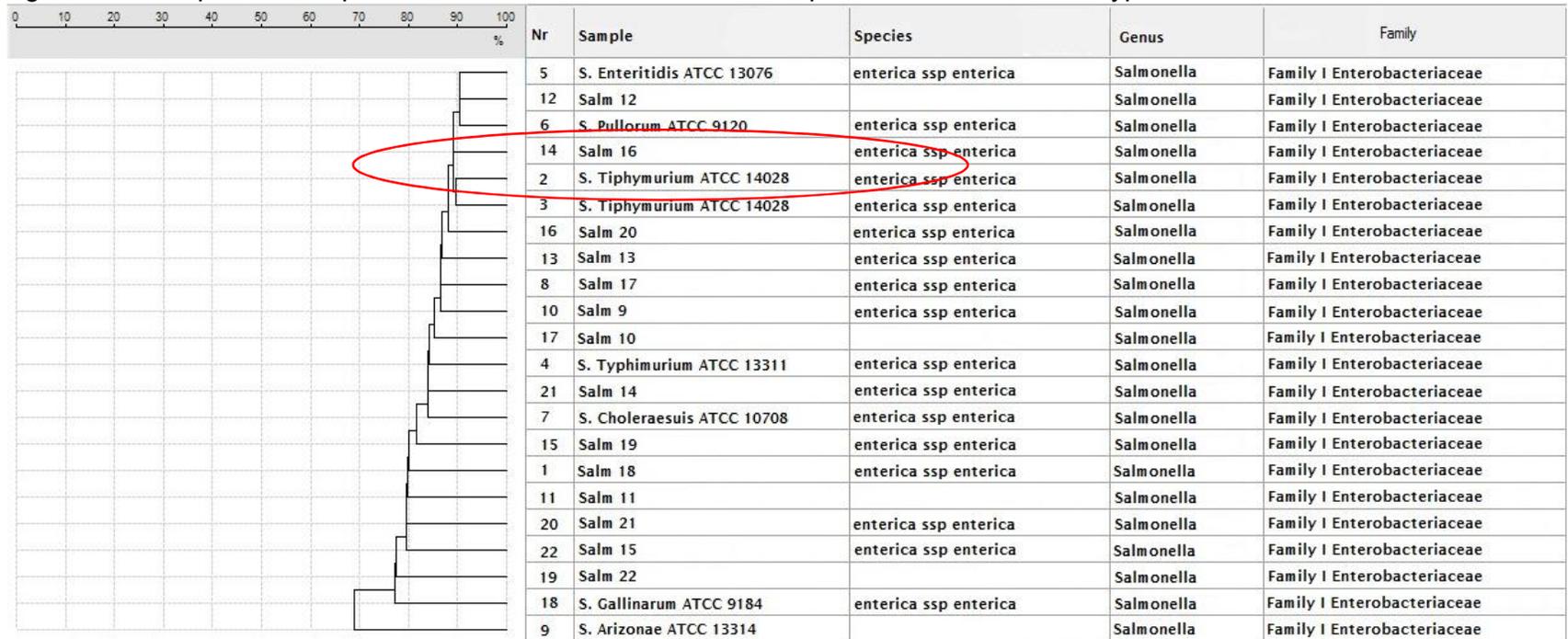
Os resultados do MALDI-TOF, que indicaram o isolado com perfil proteômico mais próximo ao de uma das cepas de referência foram confrontados com os resultados obtidos na caracterização molecular pelo MLST.

Na análise pelo MLST para *Salmonella*, o isolado SALM 16 e a cepa de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentaram os mesmos resultados para os sete alelos, sendo associados ao ST 19 (CC1). Para a *E. coli* os perfis obtidos no MALDI-TOF que indicaram o isolado EC 84 mais próximo da cepa *E. coli* ATCC 25922, não foram compatíveis com os resultados do MLST, que definiu apenas dois alelos semelhantes para essas duas estirpes. Por outro lado, a metodologia revelou quatro alelos em comum entre o isolado EC 59 e a cepa *E. coli* ATCC 23724, que foram agrupadas com maior distanciamento no dendrograma do MALDI-TOF. Já para a *L. monocytogenes*, o isolado LIST 12, que apesar de não apresentar o mesmo ST da cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644, compartilha 2 alelos em comum, o máximo de similaridade encontrado entre os isolados e as cepas de referência avaliadas.

A seleção dos isolados: SALM 16, EC 84 e LIST 12 para o preparo dos MR, foi baseada nas metodologias do MALDI-TOF e do MLST. No entanto, nesta etapa do estudo para a seleção dos isolados para o preparo dos MR foi dada maior ênfase aos resultados do MALDI-TOF, uma vez que a avaliação proteômica apresenta uma abordagem mais ampla, envolvendo um grande número de proteínas ribossomais

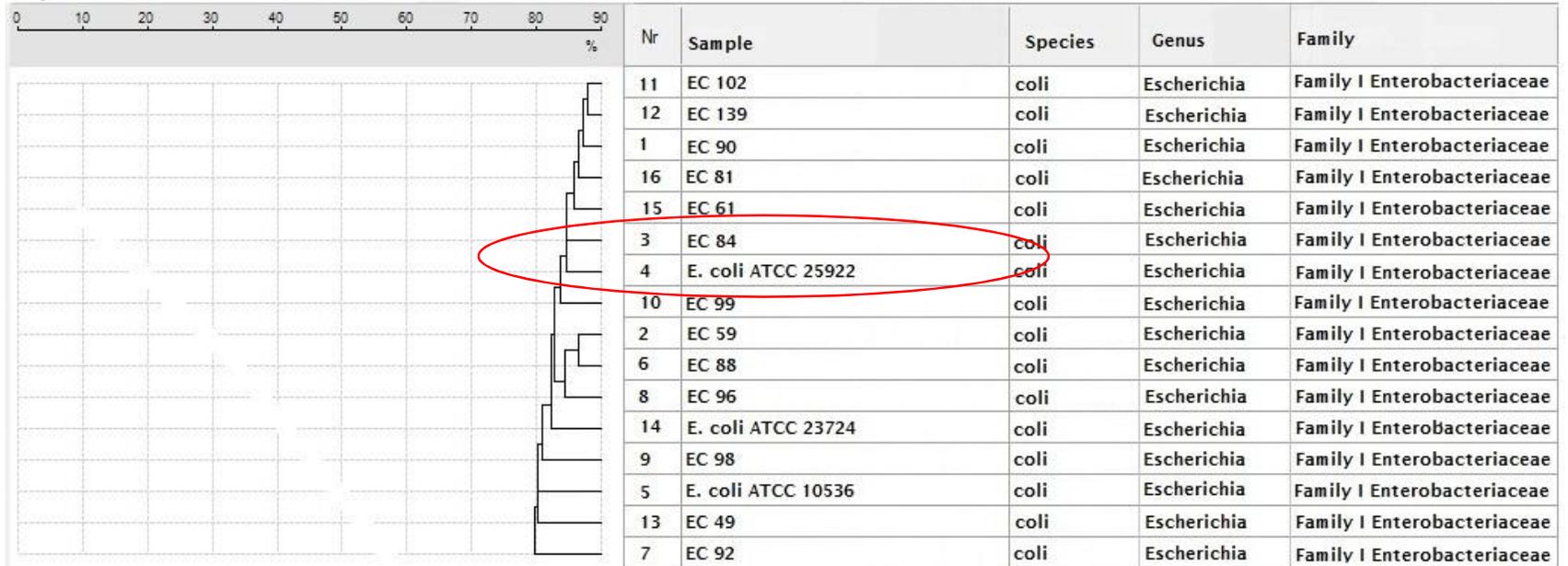
como principais constituintes do espectro de massa gerado, propiciando uma melhor comparação entre os isolados e as cepas de referência.

Figura 7 - Perfil proteômico por MALDI-TOF dos isolados e das cepas de referência de *S Typhimurium*.



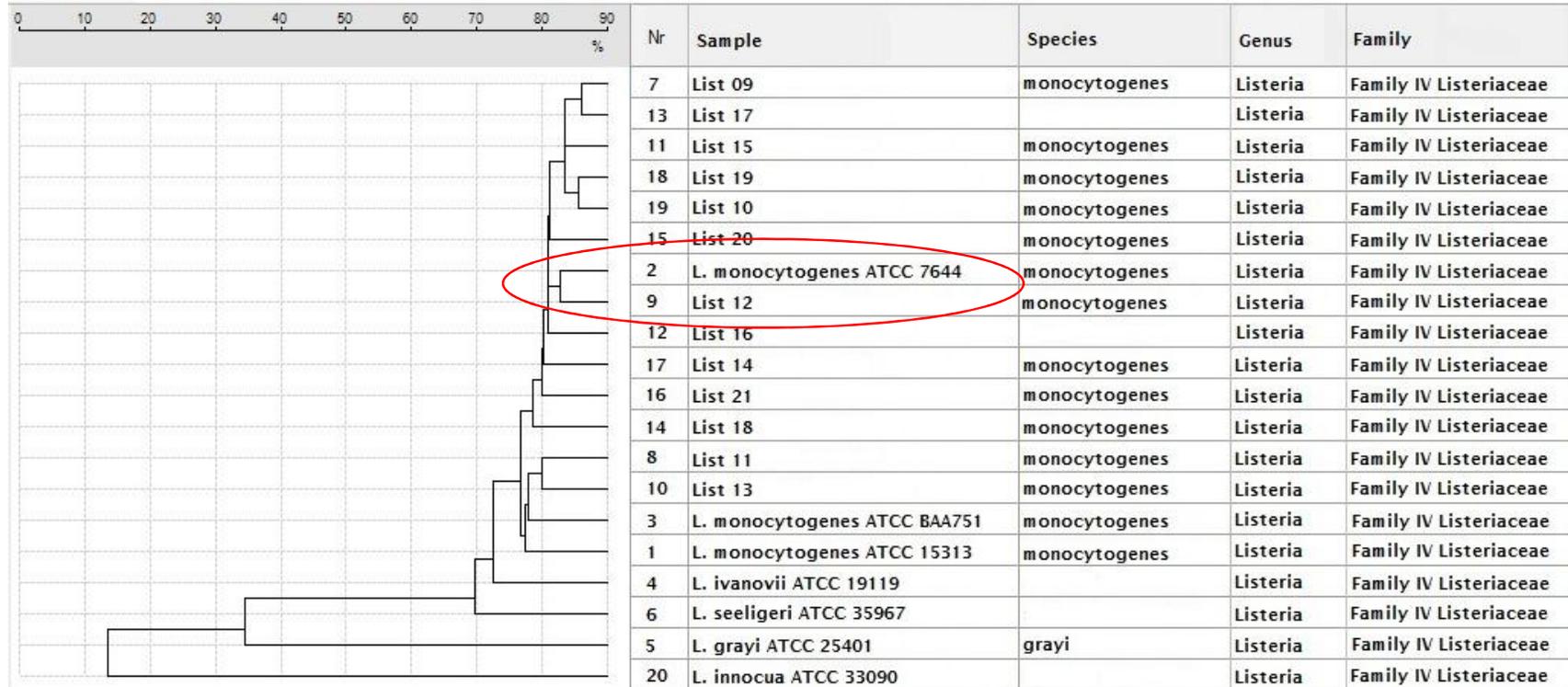
Fonte: Do autor, 2015.

Figura 8 - Perfil proteômico dos isolados e das cepas de referência de *E. coli* utilizados no estudo.



Fonte: Do autor, 2015.

Figura 9 - Perfil proteômico dos isolados e das cepas de referência de *L. monocytogenes* utilizados no estudo.



Fonte: Do autor, 2015.

4.2 Seleção dos isolados e preparo dos lotes CBR

As cepas selecionadas foram depositadas na CBRVS do INCQS/FIOCRUZ com as seguintes identificações: *S. Typhimurium* isolado SALM 16 identificação de depósito P5432; *E. coli* isolado EC 84 com identificação P5444 e *L. monocytogenes*, isolado LIST 12 com identificação de depósito de P5445.

A partir das cepas selecionadas, foram produzidos três lotes candidatos a bactérias de referência: CBR de *S. Typhimurium*, CBR de *E. coli* e CBR de *L. monocytogenes*, seguindo os “Planejamentos da Produção”, descritos no Apêndice B.

4.3 Controle dos lotes de cbr produzidos

Os controles aplicados aos CBR tiveram como objetivo atender aos requisitos técnicos essenciais das normas com escopos relacionados à produção de materiais de referência. Primeiramente foi aplicada uma das orientações da NIT-DICLA 61:2012 que aborda a viabilidade e pureza de materiais biológicos, considerada condição fundamental na aceitação dos lotes microbiológicos produzidos. A avaliação da homogeneidade e estabilidade, destacada na ABNT NBR ISO GUIA 34:2012, em vigor no momento do estudo, foram considerados requisitos essenciais na garantia da manutenção das propriedades dos materiais de referência, após o preparo.

Dos 416 frascos produzidos de cada lote, onze frascos do CBR de *S. Typhimurium* (oito do sub-lote 1 e três do sub-lote 2), 23 do CBR de *E. coli* (15 do sub-lote 1 e três do sub-lote 2) e dez do CBR de *L. monocytogenes* (três do sub-lote 1 e três do sub-lote 2) apresentaram resultado insatisfatório para o teste de vácuo e foram descartados.

4.3.1 Estudo da Viabilidade e da Pureza

O cultivo em ágar TSA, contendo 0,6% de extrato de levedura, evidenciou para os três lotes avaliados, excelente recuperação dos micro-

organismos preservados, com culturas puras, caracterizadas pelo crescimento de apenas um tipo de morfologia colonial em cada um dos lotes preparados.

4.3.2 Resultados do Teste da Homogeneidade

Os resultados das contagens de colônias realizadas visualmente de 20 frascos de cada sub-lote expressas em UFC.mL⁻¹ e as respectivas conversões em log encontram-se nas Tabelas, 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Resultados das contagens da homogeneidade dos sub-lotes do CBR de *S. Typhimurium* obtidas em UFC.mL⁻¹ e em log

Unidade do lote	Sub-lote I				Unidade do lote	Sub-lote II			
	Contagem [UFC.ml ⁻¹]	log [UFC.ml ⁻¹]	Contagem [UFC.ml ⁻¹]	log [UFC.ml ⁻¹]		Contagem [UFC.ml ⁻¹]	log [UFC.ml ⁻¹]	Contagem [UFC.ml ⁻¹]	log [UFC.ml ⁻¹]
10	1,6E+06	6,20	1,9E+06	6,30	218	2,0E+06	6,28	2,9E+06	6,46
20	2,7E+06	6,43	2,8E+06	6,28	228	1,9E+06	6,45	2,9E+06	6,46
32	1,9E+06	6,28	2,3E+06	6,40	240	2,5E+06	6,36	2,7E+06	6,43
42	2,5E+06	6,40	2,9E+06	6,38	250	2,4E+06	6,46	2,6E+06	6,41
50	1,8E+06	6,26	3,1E+06	6,30	258	2,0E+06	6,49	3,9E+06	6,59
63	1,6E+06	6,20	1,6E+06	6,30	270	2,0E+06	6,20	2,5E+06	6,40
72	3,0E+06	6,48	3,0E+06	6,34	280	2,2E+06	6,48	2,5E+06	6,40
84	3,2E+06	6,51	3,5E+06	6,26	292	1,8E+06	6,54	2,1E+06	6,32
94	2,8E+06	6,45	3,5E+06	6,40	302	2,5E+06	6,54	3,1E+06	6,49
102	3,8E+06	6,58	3,8E+06	6,28	310	1,9E+06	6,58	1,9E+06	6,28
114	2,0E+06	6,30	2,0E+06	6,45	322	2,8E+06	6,30	3,4E+06	6,53
124	2,8E+06	6,45	3,5E+06	6,26	332	1,8E+06	6,54	2,0E+06	6,30
136	2,5E+06	6,40	3,0E+06	6,18	344	1,5E+06	6,48	1,9E+06	6,28
146	2,8E+06	6,45	3,5E+06	6,30	354	2,0E+06	6,54	2,6E+06	6,41
154	2,2E+06	6,34	2,7E+06	6,26	362	1,8E+06	6,43	2,8E+06	6,45
166	2,4E+06	6,38	2,5E+06	6,15	374	1,4E+06	6,40	1,8E+06	6,26
176	1,8E+06	6,26	3,0E+06	6,15	384	1,4E+06	6,48	2,0E+06	6,30
188	2,6E+06	6,41	2,9E+06	6,18	396	1,5E+06	6,46	2,5E+06	6,40
198	2,4E+06	6,38	2,8E+06	6,08	406	1,2E+06	6,45	1,3E+06	6,11
206	2,9E+06	6,46	2,9E+06	6,26	414	1,8E+06	6,46	2,3E+06	6,36

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro

Tabela 5 - Resultados das contagens da homogeneidade dos sub-lotes do CBR de *E. coli* obtidas em UFC.mL⁻¹ e em log

Unidade do lote	Sub-lote I				Unidade do lote	Sub-lote II			
	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]		Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]
2	1,7E+06	6,23	1,8E+06	6,34	210	2,2E+06	6,26	2,3E+06	6,36
21	1,1E+06	6,04	1,7E+06	6,08	229	1,2E+06	6,23	1,9E+06	6,28
32	1,3E+06	6,11	1,8E+06	6,08	240	1,2E+06	6,26	1,6E+06	6,20
39	1,6E+06	6,20	1,8E+06	6,00	247	1,0E+06	6,26	1,6E+06	6,20
51	1,1E+06	6,04	1,2E+06	6,18	259	1,5E+06	6,08	1,8E+06	6,26
54	1,7E+06	6,23	2,0E+06	6,08	262	1,2E+06	6,30	1,9E+06	6,28
73	1,1E+06	6,04	1,5E+06	6,15	281	1,4E+06	6,18	1,7E+06	6,23
74	1,2E+06	6,08	1,4E+06	6,18	292	1,5E+06	6,15	1,5E+06	6,18
91	1,5E+06	6,18	1,8E+06	6,15	299	1,4E+06	6,26	1,8E+06	6,26
103	1,0E+06	6,00	1,9E+06	6,00	311	1,0E+06	6,28	1,3E+06	6,11
106	1,1E+06	6,04	1,2E+06	6,04	314	1,1E+06	6,08	1,3E+06	6,11
125	9,0E+05	5,95	1,7E+06	5,85	333	7,0E+05	6,23	7,0E+05	5,85
136	1,0E+06	6,00	1,8E+06	6,08	344	1,2E+06	6,26	1,4E+06	6,15
143	8,0E+05	5,90	1,3E+06	5,95	352	9,0E+05	6,11	1,2E+06	6,08
155	7,0E+05	5,85	8,0E+05	5,90	363	8,0E+05	5,90	1,3E+06	6,11
158	1,1E+06	6,04	1,7E+06	5,85	365	7,0E+05	6,23	1,2E+06	6,08
177	8,0E+05	5,90	1,6E+06	6,15	385	1,4E+06	6,20	1,9E+06	6,28
188	1,0E+06	6,00	1,0E+06	6,00	396	1,0E+06	6,00	1,6E+06	6,20
192	1,5E+06	6,18	1,5E+06	5,90	403	8,0E+05	6,18	1,0E+06	6,00
207	1,4E+06	6,15	2,1E+06	6,20	408	1,6E+06	6,32	2,1E+06	6,32

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.mL⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro

Tabela 6 - Resultados das contagens da homogeneidade do lote CBR de *L. monocytogenes* obtidas em UFC e em log

Unidade do lote	Sub-lote I				Unidade do lote	Sub-lote II			
	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]		Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]	Contagem [UFC.mL ⁻¹]	log [UFC.mL ⁻¹]
4	1,5E+07	7,18	1,6E+07	7,23	212	1,7E+07	7,20	1,8E+07	7,26
11	1,3E+07	7,11	1,3E+07	7,15	219	1,4E+07	7,11	1,5E+07	7,18
24	1,3E+07	7,11	1,5E+07	7,18	232	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,18
35	1,4E+07	7,15	1,4E+07	7,15	243	1,4E+07	7,15	1,4E+07	7,15
47	1,8E+07	7,26	1,9E+07	7,11	255	1,3E+07	7,28	1,3E+07	7,11
56	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,18	264	1,5E+07	7,18	1,7E+07	7,23
63	1,3E+07	7,11	1,4E+07	7,15	271	1,4E+07	7,15	1,6E+07	7,20
76	1,6E+07	7,20	1,7E+07	7,08	284	1,2E+07	7,23	1,4E+07	7,15
87	1,3E+07	7,11	1,4E+07	7,11	295	1,3E+07	7,15	1,4E+07	7,15
99	1,6E+07	7,20	1,8E+07	7,18	307	1,5E+07	7,26	1,6E+07	7,20
108	1,6E+07	7,20	1,7E+07	7,11	316	1,3E+07	7,23	1,4E+07	7,15
115	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,18	323	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,18
128	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,20	336	1,6E+07	7,18	1,6E+07	7,20
139	1,6E+07	7,20	1,6E+07	7,26	347	1,8E+07	7,20	1,9E+07	7,28
151	1,7E+07	7,23	1,9E+07	7,20	359	1,6E+07	7,28	1,8E+07	7,26
160	1,6E+07	7,20	2,0E+07	7,20	368	1,6E+07	7,30	1,6E+07	7,20
167	1,6E+07	7,20	1,7E+07	7,18	375	1,5E+07	7,23	1,5E+07	7,18
180	1,5E+07	7,18	1,5E+07	7,20	388	1,6E+07	7,18	1,6E+07	7,20
191	1,6E+07	7,20	1,6E+07	7,23	399	1,7E+07	7,20	1,7E+07	7,23
203	1,3E+07	7,11	1,5E+07	7,23	410	1,7E+07	7,18	2,0E+07	7,30

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.mL⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro

A avaliação estatística do teste pela ANOVA, classificou todos os sub-lotes analisados individualmente como “suficientemente homogêneos”.

A Tabela 7 fornece os dados pela análise da ANOVA, obtidos em planilha Excel, relativos à avaliação da homogeneidade dos sub-lotes produzidos.

Tabela 7 - Resultados do teste da homogeneidade dos sub-lotes produzidos pela análise da variância (ANOVA)

Dados da ANOVA	lotes					
	<i>S.Typhimurium</i>		<i>E. coli</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	Sub-lote I	Sub-lote II	Sub-lote I	Sub-lote II	Sub-lote I	Sub-lote II
Desvio Padrão (σ_p)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Valores dispersos eliminados	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Médias contagens placas	6,414	6,328	6,123	6,117	7,188	7,187
Desvio Padrão Tolerável (σ_{all2})	0,0056	0,0056	0,0056	0,0056	0,0056	0,0056
Variância Analítica (S_{an2})	0,0043	0,0085	0,0013	0,0096	0,0007	0,0006
Variância entre Amostras (S_{am2})	0,0067	0,0049	0,0029	0,0095	0,0017	0,0019
"c" crítico	0,011	0,014	0,016	0,014	0,009	0,009
Resultado	SH	SH	SH	SH	SH	SH

Fonte: Do autor, 2016.

NE- nenhum; SH- "suficientemente homogêneos".

A avaliação da homogeneidade entre cada dois sub-lotes liofilizados em momentos diferentes foi realizada com a aplicação do teste F, em planilha Excel. Foi estabelecida a hipótese de equivalência entre os sub-lotes. Seguindo os dados das Tabelas 10 a 12, pode-se observar que os resultados obtidos, nos três grupos de sub-lotes, apresentaram $F > F_{crítico}$, indicando a rejeição da hipótese de equivalência para cada uma das três duplas de sub-lotes.

Foi então aplicado o teste t (Tabelas 8 a 10), em planilha Excel, presumindo variâncias diferentes, porém buscando-se a hipótese de equivalência entre as médias das duplas. O teste t, aplicado para a dupla de sub-lotes dos CBR de *S. Typhimurium*, citado na Tabela 8, gerou $Stat t > t_{crítico}$ bi-caudal e a hipótese foi rejeitada, sendo os sub-lotes considerados não equivalentes. Entretanto, para os sub-lotes dos CBR de *E. coli* e CBR de *L. monocytogenes*, os resultados descritos nas Tabelas 9 e 10 indicaram $Stat t < t_{crítico}$ bi-caudal sendo as hipóteses das equivalências aceitas.

Assim, os sub-lotes CBR de *E. coli* e CBR de *L. monocytogenes* foram considerados homogêneos, passando a representar lotes únicos de CBR. Já, os sub-lotes do CBR de *S. Typhimurium* classificados como não homogêneos passaram a ser representados como sub-lote I e sub-lote II.

Assim, para os sub-lotes do CBR de *S. Typhimurium* a verificação da estabilidade, que avalia o parâmetro quantitativo, foi realizada para cada um

dos sub-lotes separadamente. Para os demais testes de controle, todos fundamentados em parâmetros qualitativos, a seleção dos fracos foi feita aleatoriamente, contemplando metade do número de frascos de cada um dos sub-lotes.

Apesar dos materiais terem sido preparados pelo mesmo processo, a não equivalência numérica de contagem entre os sub-lotes do CBR de *S. Typhimurium*, verificada pela avaliação estatística das contagens, pode ser atribuída ao fato de terem sido liofilizados em momentos distintos, porém em condições de dessecação semelhantes, mas que foram diferenciadas pelo funcionamento do equipamento.

Tabela 8. Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de *S. Typhimurium*

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,413619607	6,328143223
Variância	0,01086904	0,013249784
Observações	40	40
gl	39	39
F	0,820318285	
P(F<=f) uni-caudal	0,269607032	
F crítico uni-caudal	0,586694336	
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,413619607	6,328143223
Variância	0,01086904	0,013249784
Observações	40	40
Hipótese da diferença de média	0	
gl	77	
Stat t	3,48095233	
P(T<=t) uni-caudal	0,000413147	
t crítico uni-caudal	1,664884537	
P(T<=t) bi-caudal	0,000826293	
t crítico bi-caudal	1,991254395	

Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 9 - Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de CBR *E. coli*

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,122911887	6,11717293
Variância	0,015817504	0,018859756
Observações	40	40
gl	39	39
F	0,838690784	
P(F<=f) uni-caudal	0,292728781	
F crítico uni-caudal	0,586694336	
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	6,122911887	6,11717293
Variância	0,015817504	0,018859756
Observações	40	40
Hipótese da diferença de média	0	
gl	77	
Stat t	0,194912878	
P(T<=t) uni-caudal	0,422987265	
t crítico uni-caudal	1,664884537	
P(T<=t) bi-caudal	0,845974531	
t crítico bi-caudal	1,991254395	

Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 10 - Teste F e teste t aplicados no estudo da homogeneidade dos sub-lotes de CBR *L. monocytogenes*

Teste-F: duas amostras para variâncias		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,188431346	7,186939945
Variância	0,002296859	0,002390265
Observações	40	40
gl	39	39
F	0,960922471	
P(F<=f) uni-caudal	0,450788937	
F crítico uni-caudal	0,586694336	
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,188431346	7,186939945
Variância	0,002296859	0,002390265
Observações	40	40
Hipótese da diferença de média	0	
gl	78	
Stat t	0,137775225	
P(T<=t) uni-caudal	0,445386555	
t crítico uni-caudal	1,664624645	
P(T<=t) bi-caudal	0,890773111	
t crítico bi-caudal	1,990847069	

Fonte: Do autor, 2016.

4.3.3 Resultados do Estudo da Estabilidade

4.3.3.1 Estabilidade de Longa Duração

A estabilidade de longa duração avaliou a instabilidade dos materiais sob condições de estoque, nas temperaturas de armazenamento (-20 °C) e de referência (-70 °C), ao longo de um ano. As análises foram realizadas quinzenalmente, com dois frascos armazenados em cada uma das temperaturas. As Tabelas 11, 13, 15 e 17 descrevem as médias das contagens em UFC.mL⁻¹ dos lotes CBR, nas temperaturas avaliadas.

As Tabelas 12, 14 e 16 apresentam os dados da análise de resíduos de regressão linear, obtidos no programa Microsoft Excel, com os valores do coeficiente angular de inclinação, do erro do coeficiente angular e da probabilidade *t* de Student, que definem a estabilidade do material. Como critério de avaliação, foi estabelecido que o módulo do coeficiente angular deve apresentar valor menor que o produto da probabilidade *t* de Student pelo erro do coeficiente angular (s_b) (ABNT, 2012b).

As Figuras 10 a 12 ilustram as variações da concentração de células, nas duas temperaturas, ao longo do estudo. Os gráficos mostram os valores de contagem, convertidos em Log₁₀, posicionados no eixo y, correlacionados com a variável tempo, posicionada no eixo x.

Tabela 11. Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e -70°C

Intervalo em dias	- 20 °C			- 70 °C		
	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	2,1E+06	2,5E+06	6,36	2,9E+06	2,5E+06	6,43
13	2,0E+06	2,1E+06	6,31	2,4E+06	2,4E+06	6,38
27	2,0E+06	2,0E+06	6,30	2,7E+06	2,6E+06	6,42
41	1,6E+06	2,4E+06	6,30	2,3E+06	2,6E+06	6,39
55	2,8E+06	1,9E+06	6,37	2,4E+06	2,0E+06	6,34
69	2,0E+06	2,8E+06	6,38	2,4E+06	2,1E+06	6,35
78	2,4E+06	2,7E+06	6,41	2,9E+06	2,1E+06	6,40
99	2,3E+06	1,1E+06	6,23	1,7E+06	2,4E+06	6,31
110	2,3E+06	2,4E+06	6,37	2,0E+06	2,2E+06	6,32
134	2,5E+06	1,6E+06	6,31	2,1E+06	1,7E+06	6,28
146	1,7E+06	2,4E+06	6,31	2,1E+06	2,6E+06	6,37
160	2,1E+06	1,2E+06	6,22	1,8E+06	1,4E+06	6,20
174	1,2E+06	1,3E+06	6,10	1,6E+06	1,7E+06	6,22
189	1,6E+06	1,8E+06	6,23	2,0E+06	1,8E+06	6,28
202	2,3E+06	1,7E+06	6,30	1,7E+06	2,1E+06	6,28
222	2,0E+06	2,0E+06	6,30	2,5E+06	1,8E+06	6,33
236	1,8E+06	1,7E+06	6,24	1,8E+06	1,6E+06	6,23
251	2,3E+06	1,9E+06	6,32	1,5E+06	2,0E+06	6,24
265	2,3E+06	2,2E+06	6,35	2,4E+06	2,5E+06	6,39
281	2,0E+06	2,1E+06	6,31	2,7E+06	2,5E+06	6,41
294	1,5E+06	1,4E+06	6,16	1,7E+06	1,9E+06	6,26
309	1,8E+06	1,2E+06	6,18	2,6E+06	2,4E+06	6,40
327	2,1E+06	1,3E+06	6,23	2,6E+06	2,8E+06	6,43
341	1,7E+06	2,0E+06	6,27	2,4E+06	2,5E+06	6,39
356	1,8E+06	1,9E+06	6,27	2,3E+06	2,6E+06	6,39

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

Tabela 12 - Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 1 do CBR *S. Typhimurium* a -20 e -70 °C

Temperatura	Coefficiente Angular (b)	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
-20 °C	-0,000302	0,000129	2,068658	0,000267	0,000302	Instável
-70 °C	0,000066	0,000137	2,068658	0,000283	0,000066	Estável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student

Tabela 13 - Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do Sub-lote 2 do CBR *Salmonella* Typhimurium

Intervalo em dias	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$			$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$		
	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	1,9E+06	2,0E+06	6,29	1,8E+06	2,1E+06	6,29
13	1,9E+06	2,1E+06	6,30	1,6E+06	2,0E+06	6,26
27	2,0E+06	2,3E+06	6,33	1,7E+06	2,1E+06	6,28
41	2,5E+06	1,4E+06	6,29	2,9E+06	1,8E+06	6,37
55	3,2E+06	3,8E+06	6,54	2,5E+06	2,2E+06	6,37
69	2,0E+06	2,2E+06	6,32	2,2E+06	1,9E+06	6,31
78	2,5E+06	2,6E+06	6,41	2,4E+06	2,7E+06	6,41
99	1,6E+06	1,6E+06	6,20	1,6E+06	1,6E+06	6,20
110	2,0E+06	2,2E+06	6,32	1,8E+06	2,9E+06	6,37
134	1,2E+06	1,8E+06	6,18	1,2E+06	2,0E+06	6,20
146	1,0E+06	1,8E+06	6,15	1,4E+06	1,3E+06	6,13
160	1,2E+06	1,8E+06	6,18	2,2E+06	1,6E+06	6,28
174	1,4E+06	1,6E+06	6,18	2,1E+06	2,2E+06	6,33
189	1,3E+06	1,4E+06	6,13	1,8E+06	2,4E+06	6,32
202	1,4E+06	2,0E+06	6,23	2,2E+06	2,0E+06	6,32
222	1,6E+06	1,6E+06	6,20	2,3E+06	2,6E+06	6,39
236	1,4E+06	1,6E+06	6,18	2,4E+06	2,5E+06	6,39
251	1,5E+06	1,4E+06	6,16	2,4E+06	2,7E+06	6,41
265	2,3E+06	2,2E+06	6,35	2,4E+06	2,5E+06	6,39
281	2,0E+06	2,0E+06	6,30	2,7E+06	2,4E+06	6,41
294	1,4E+06	1,3E+06	6,13	2,2E+06	2,8E+06	6,40
309	1,1E+06	2,1E+06	6,20	2,2E+06	2,5E+06	6,37
327	2,1E+06	2,0E+06	6,31	2,7E+06	2,7E+06	6,43
341	1,6E+06	1,7E+06	6,22	2,4E+06	2,8E+06	6,41
356	1,7E+06	2,0E+06	6,27	2,2E+06	2,4E+06	6,36

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

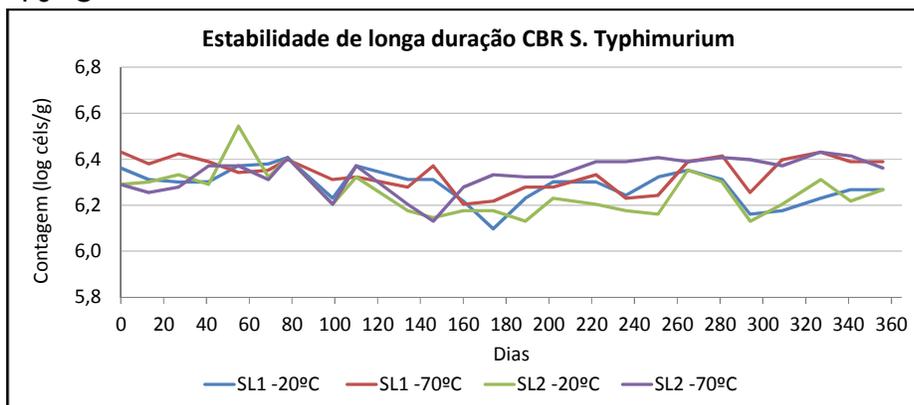
Tabela 14 - Análise de resíduos de regressão linear do sub-lote 2 do CBR *S. Typhimurium* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Temperatura	Coefficiente Angular (b)	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	-0,000083	0,000096	2,068658	0,000200	0,000083	Estável
$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	0,000136	0,000245	2,068658	0,000507	0,000136	Estável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student

Figura 10. Variação da concentração de células dos Sub-lotes do CBR *S. Typhimurium* ao longo de 356 dias de estoque a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$



Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 15 - Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e -70 °C do CBR *E. coli*

Intervalo em dias	- 20 °C			- 70 °C		
	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	1,6E+06	2,0E+06	6,26	1,8E+06	1,6E+06	6,23
13	9,9E+05	1,8E+06	6,14	1,4E+06	9,3E+05	6,07
27	2,9E+06	1,9E+06	6,38	2,2E+06	2,4E+06	6,36
41	2,8E+06	2,4E+06	6,41	2,1E+06	2,3E+06	6,34
55	1,7E+06	2,3E+06	6,30	2,0E+06	1,7E+06	6,27
69	2,0E+06	1,8E+06	6,28	2,1E+06	8,5E+05	6,17
78	1,2E+06	9,0E+05	6,02	1,3E+06	1,3E+06	6,11
99	1,6E+06	1,6E+06	6,20	1,7E+06	1,5E+06	6,20
110	1,1E+06	1,3E+06	6,08	1,0E+06	1,6E+06	6,11
134	1,0E+06	1,0E+06	6,00	1,0E+06	1,0E+06	6,00
146	9,8E+05	1,2E+06	6,04	1,0E+06	1,1E+06	6,02
160	1,4E+06	1,5E+06	6,16	1,4E+06	1,7E+06	6,19
174	1,2E+06	1,3E+06	6,10	1,3E+06	1,4E+06	6,13
189	1,1E+06	1,2E+06	6,06	1,1E+06	1,6E+06	6,13
202	1,2E+06	2,3E+06	6,24	1,2E+06	1,6E+06	6,15
222	1,2E+06	1,3E+06	6,10	1,5E+06	1,4E+06	6,16
236	1,4E+06	1,7E+06	6,19	1,5E+06	1,5E+06	6,18
251	1,1E+06	1,5E+06	6,11	1,3E+06	1,5E+06	6,15
265	1,7E+06	1,8E+06	6,24	1,7E+06	1,8E+06	6,24
281	1,1E+06	1,1E+06	6,04	1,2E+06	1,2E+06	6,08
294	1,5E+06	1,6E+06	6,19	1,5E+06	1,5E+06	6,18
309	1,5E+06	1,6E+06	6,19	2,1E+06	1,8E+06	6,29
327	1,4E+06	1,6E+06	6,18	2,0E+06	1,8E+06	6,28
341	1,6E+06	1,1E+06	6,13	1,5E+06	2,1E+06	6,26
356	1,4E+06	1,5E+06	6,16	1,6E+06	2,1E+06	6,27

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

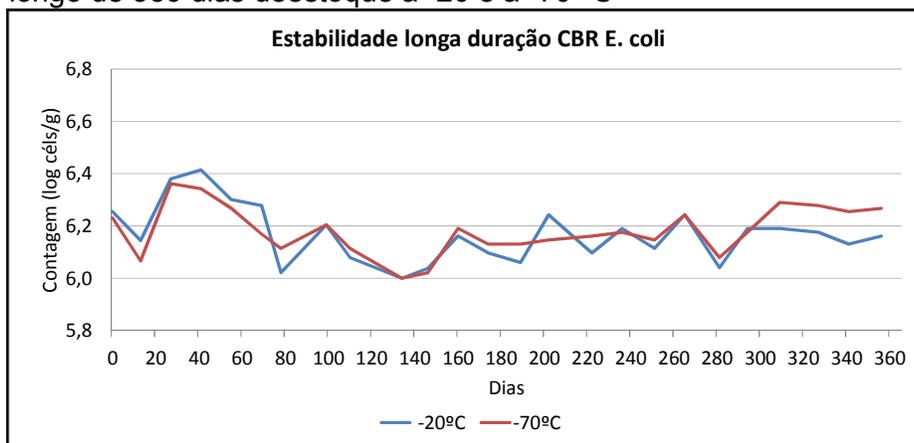
Tabela 16. Análise de resíduos de regressão linear do CBR *E. coli* a -20 e -70 °C

Temperatura	Coefficiente Angular (b)	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
-20 °C	-0,000291	0,000191	2,068658	0,000395	0,000291	Estável
-70 °C	0,000084	0,000177	2,068658	0,000366	0,000084	Estável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

Figura 11. Variação da concentração de células do CBR *E. coli* ao longo de 356 dias de estocagem a -20 e a -70 °C



Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 17 - Resultado do estudo da estabilidade de longa duração nas temperaturas de -20 e -70 °C do CBR *L. monocytogenes*

Intervalo em dias	- 20 °C			- 70 °C		
	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	2,2E+07	1,7E+07	7,29	1,5E+07	2,1E+07	7,26
13	1,7E+07	1,7E+07	7,23	1,9E+07	2,0E+07	7,29
27	1,6E+07	1,8E+07	7,23	1,6E+07	1,7E+07	7,22
41	1,7E+07	1,8E+07	7,24	1,8E+07	1,5E+07	7,22
55	1,4E+07	1,1E+07	7,10	1,2E+07	1,1E+07	7,06
69	2,0E+07	2,2E+07	7,32	1,2E+07	1,2E+07	7,08
79	1,2E+07	1,6E+07	7,15	1,2E+07	1,1E+07	7,06
100	1,9E+07	1,8E+07	7,27	1,6E+07	1,9E+07	7,24
111	1,9E+07	1,7E+07	7,26	1,6E+07	1,4E+07	7,18
132	1,8E+07	1,5E+07	7,22	1,3E+07	1,8E+07	7,19
145	1,1E+07	9,8E+06	7,02	1,2E+07	1,1E+07	7,06
159	1,0E+07	1,1E+07	7,02	1,1E+07	1,1E+07	7,04
173	9,8E+06	1,1E+07	7,02	1,1E+07	1,0E+07	7,02
188	1,5E+07	1,4E+07	7,16	1,6E+07	1,3E+07	7,16
201	1,0E+07	1,0E+07	7,00	1,2E+07	1,0E+07	7,04
222	1,3E+07	1,3E+07	7,11	1,4E+07	1,5E+07	7,16
236	1,5E+07	1,3E+07	7,15	1,6E+07	1,6E+07	7,20
251	1,2E+07	1,3E+07	7,10	1,1E+07	1,2E+07	7,06
264	1,2E+07	1,2E+07	7,08	1,1E+07	1,1E+07	7,04
281	1,3E+07	1,2E+07	7,10	1,2E+07	1,5E+07	7,13
292	1,3E+07	1,3E+07	7,11	1,4E+07	1,3E+07	7,13
309	1,0E+07	1,0E+07	7,00	1,1E+07	1,1E+07	7,04
327	1,1E+07	1,2E+07	7,06	1,0E+07	1,4E+07	7,08
341	1,0E+07	1,2E+07	7,04	1,4E+07	1,2E+07	7,11
355	1,2E+07	1,3E+07	7,10	1,4E+07	1,6E+07	7,18
370	----	----	----	1,6E+07	1,6E+07	7,20

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

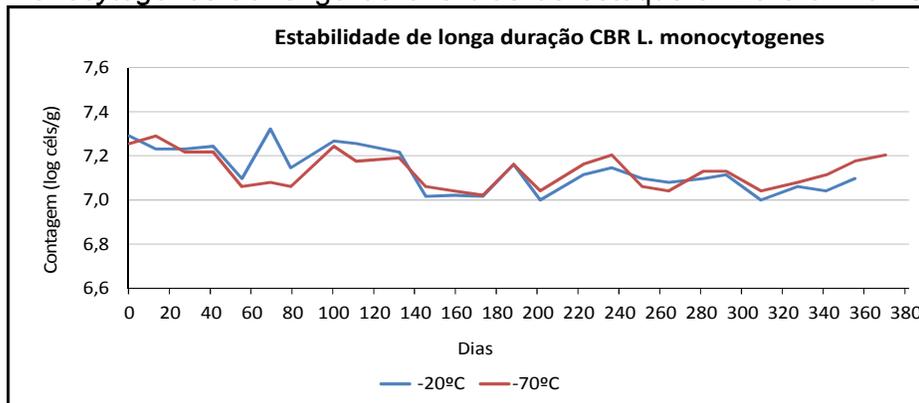
Tabela 18 - Análise de resíduos de regressão linear do CBR *L. monocytogenes* a -20 e -70 °C

Temperatura	Coefficiente Angular (b)	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
-20 °C	-0,000590	0,000138	2,068658	0,000286	0,000590	Instável
-70 °C	-0,000216	0,000132	2,063899	0,000273	0,000216	Estável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

Figura 12 - Variação da concentração de células do CBR de *L. monocytogenes* ao longo de 375 dias de estoque a -20 e a -70 °C



Fonte: Do autor, 2016.

Os resultados encontrados definem que os lotes de CBR testados não apresentaram variações na concentração de células ao longo do período do estudo, sendo todos os lotes classificados como estáveis na temperatura de referência (-70 °C). No entanto, na temperatura de armazenamento (-20 °C), o sub-lote 1 do CBR de *S. Typhimurium* e o CBR de *L. monocytogenes* apresentaram instabilidade no decorrer do teste. Novos cálculos de regressão linear foram aplicados aos dois lotes citados, a fim de determinar o prazo máximo de estabilidade a -20 °C. Para o sub-lote 1 do CBR de *S. Typhimurium* foi determinada a estabilidade a -20 °C em até 225 dias de estoque (Tabela 19). Para o lote de *L. monocytogenes*, foi verificada a estabilidade a -20 °C por um período máximo de 165 dias (Tabela 20).

Tabela 19 - Análise de resíduos de regressão linear do sub-lote 1 do CBR *Salmonella* Typhimurium a -20 °C, durante 225 dias de armazenamento

Temperatura	Coefficiente Angular (b)	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
-20 °C	-0,000534	0,000265	2,144787	0,000569	0,000534	Estável

Fonte: Do autor, 2016.
t – t de Student.

Tabela 20 - Análise de resíduos de regressão linear do CBR de *L. monocytogenes* a -20 °C, durante 165 dias de armazenamento

Temperatura	Coefficiente Angular	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
-20 °C	-0,001094	0,000504	2,228139	0,001123	0,001094	Estável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

O estudo da estabilidade indicou uma diferença da estabilidade dos materiais nas duas temperaturas estudadas, mostrando que apesar dos materiais terem sido submetidos ao processo de liofilização, que é reconhecidamente uma técnica que promove estabilidade as células, a temperatura de -70 °C, como era esperado exerceu efeito mais adequado na manutenção dos materiais. Os resultados encontrados se alinham com as informações de autores que sugerem que bactérias submetidas a processos de dessecação como *spray drying* ou liofilização apresentam maior estabilidade quando estocadas em temperaturas abaixo de -20 °C (IN'T VELD, 1998, GU; CHOI; KIM, 2001).

O estudo da estabilidade a -70 °C será continuado, durante a utilização e estoque dos lotes, com intervalos de análise mais prolongados de três meses.

Os dados gerados no estudo da estabilidade foram comparados com resultados obtidos por pesquisadores do *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) da Bélgica, que desenvolveram materiais de referência microbiológicos certificados, produzidos em formato de esferas, chamados *BioBall*. A produção dos referidos MR foi realizada com a utilização de um citometro de fluxo visando definir concentrações precisas dos micro-organismos. Os MRC de *S. Enteritidis* (BAETS et al, 2008a) e de *E. coli* O157 (BAETS et al, 2008b) foram produzidos em concentrações aproximadas de 5 UFC/esfera e os materiais de *Candida albicans* (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009a) e de *Enterococcus faecalis* (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009c) em concentrações de 1.000UFC/esfera. Em uma segunda etapa, os materiais foram congelados e liofilizados em matriz composta de proteína e carboidrato, cuja composição não foi informada.

Os MR foram estocados a -70 °C e a -20 °C e submetidos ao estudo da estabilidade através da contagem de UFC/esfera em meios de cultura ricos em nutrientes. Os MRC contendo *S. Enteritidis* e *E. coli* O157 permaneceram estáveis a -20 °C por até 12 meses e a -70 °C por até 54 meses. Os lotes preparados com

Enterococcus faecalis e *Candida albicans* foram descritos como estáveis a -20 °C e a -70 °C por até 18 meses (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009b, 2009c).

Os resultados indicaram os materiais do IRMM mais estáveis a -20 °C que os materiais deste estudo. Isto pode ser função de procedimentos de produção diferenciados, ou pela utilização da matriz combinada com proteína e carboidrato, não definida pelos autores.

4.3.3.2 Estabilidade de Curta Duração (estabilidade de transporte)

O estudo da estabilidade de curta duração avaliou as variações na concentração de células, durante quatro dias nas temperaturas de 4 e 38 °C. O estudo teve como objetivo avaliar a manutenção da concentração de células neste período, simulando o tempo de transporte dos materiais do provedor ao laboratório.

Os resultados do estudo com os CBR encontram-se descritos nas Tabelas 21 a 28. A avaliação estatística por regressão linear mostrou estabilidade de todos os lotes avaliados a 4 °C, indicando que a concentração de células dos lotes não variou durante o período de estudo. Contudo, foi demonstrada a queda da concentração de células dos CBR, quando expostos à temperatura de 38 °C. As Figuras 13 a 15 esboçam a concentração de células ao longo dos 4 dias de estudo nas temperaturas de 4 e 38 °C.

Tabela 21 - Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do Sub-lote 1 do CBR de *S. Typhimurium*

Intervalo em dias	4 °C			38 °C		
	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média item 1 [UFC.ml ⁻¹]	média item 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	2,1E+06	2,3E+06	6,34	2,1E+06	2,3E+06	6,34
1	1,9E+06	2,0E+06	6,29	1,1E+06	1,2E+06	6,07
2	2,2E+06	2,2E+06	6,34	9,0E+05	1,0E+06	5,98
3	2,0E+06	2,3E+06	6,33	6,8E+05	7,4E+05	5,85
4	2,0E+06	2,6E+06	6,36	4,4E+05	4,7E+05	5,65

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro

Tabela 22 - Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 1 do CBR de *S. Typhimurium* a 4 e a 38 °C

Temperatura	Coefficiente Angular	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
4 °C	0,006550	0,007859	3,182446	0,025011	0,006550	Estável
38 °C	-0,158476	0,015974	3,182446	0,050836	0,158476	Instável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

Tabela 23 - Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38 °C do Sub-lote 2 do CBR de *S. Typhimurium*

Intervalo em dias	4 °C			38 °C		
	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	2,2E+06	2,4E+06	6,36	2,2E+06	2,4E+06	6,36
1	1,8E+06	2,0E+06	6,27	1,2E+06	1,3E+06	6,09
2	2,0E+06	2,2E+06	6,32	7,6E+05	7,6E+05	5,88
3	2,0E+06	2,1E+06	6,30	5,8E+05	6,1E+05	5,77
4	2,0E+06	2,2E+06	6,32	4,3E+05	5,2E+05	5,67

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

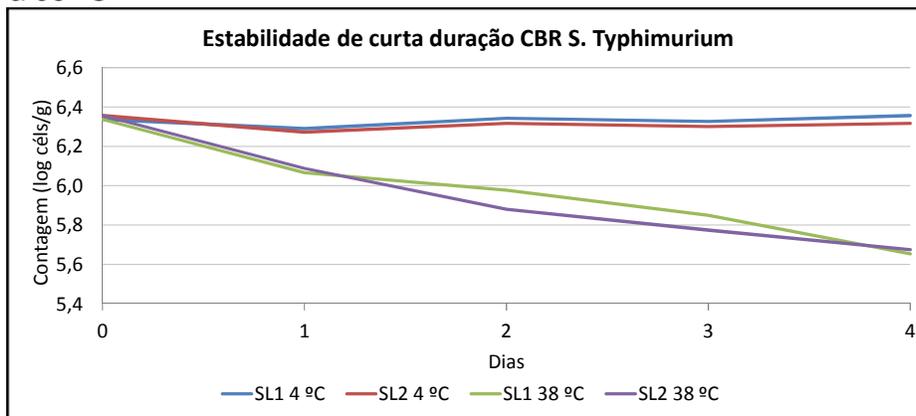
Tabela 24 - Análise de resíduos de regressão linear do Sub-lote 2 do CBR de *S. Typhimurium* a 4 e a 38 °C

Temperatura	Coefficiente Angular	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
4 °C	0,005019	0,010892	3,182446	0,034663	0,005019	Estável
38 °C	-0,168626	0,022243	3,182446	0,070786	0,168626	Instável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student

Figura 13 - Variação da concentração diária de células dos Sub-lotes 1 e 2 do CBR *S. Typhimurium* durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C



Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 25 - Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do CBR de *E.coli*

Intervalo em dias	4 °C			38 °C		
	média item 1	média item 2	log das médias	média item 1	média item 2	log das médias
	[UFC.ml ⁻¹]					
0	1,4E+06	1,4E+06	6,14	1,4E+06	1,4E+06	6,13
1	1,2E+06	1,2E+06	6,07	8,4E+05	9,5E+05	5,95
2	1,1E+06	1,2E+06	6,04	8,2E+05	8,0E+05	5,91
3	1,1E+06	1,5E+06	6,11	6,2E+05	6,2E+05	5,79
4	1,4E+06	1,4E+06	6,14	2,6E+05	2,9E+05	5,44

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

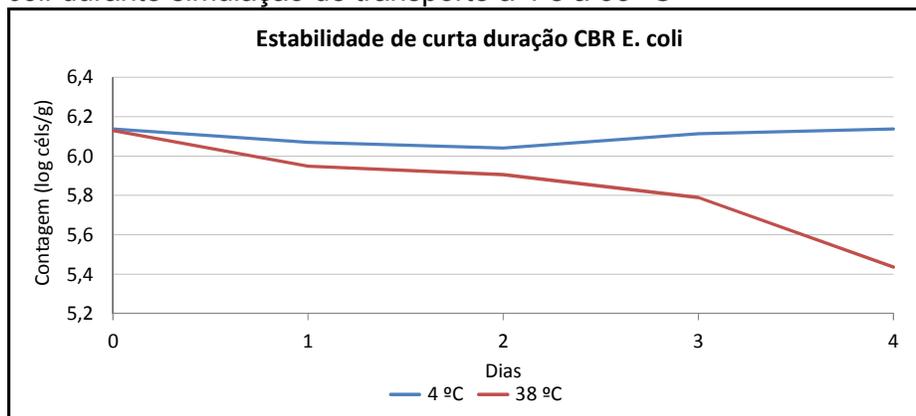
Tabela 26 - Análise de resíduos de regressão linear do CBR de *E. coli* a 4 e a 38 °C

Temperatura	Coefficiente Angular	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
4 °C	0,008330	0,013570	3,182450	0,043186	0,008330	Estável
38 °C	-0,136140	0,021420	3,182450	0,068168	0,136140	Instável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

Figura 14 - Variação da concentração diária de células do CBR *E. coli* durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C



Fonte: Do autor, 2016.

Tabela 27. Resultado do estudo da estabilidade de curta duração na temperatura de 4 °C e 38°C do CBR de *L. monocytogenes*

Intervalo em dias	4 °C			38 °C		
	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 1 [UFC.ml ⁻¹]	média ítem 2 [UFC.ml ⁻¹]	log das médias [UFC.ml ⁻¹]
0	1,9E+07	2,0E+07	7,29	1,9E+07	2,0E+07	7,28
1	1,8E+07	1,9E+07	7,26	1,6E+07	1,6E+07	7,19
2	1,8E+07	1,8E+07	7,25	7,8E+06	7,4E+06	6,88
3	1,4E+07	1,8E+07	7,20	5,6E+06	4,1E+06	6,65
4	1,6E+07	1,7E+07	7,23	4,3E+06	5,1E+06	6,62

Fonte: Do autor, 2016.

UFC.ml⁻¹- unidade formadora de colônia por mililitro.

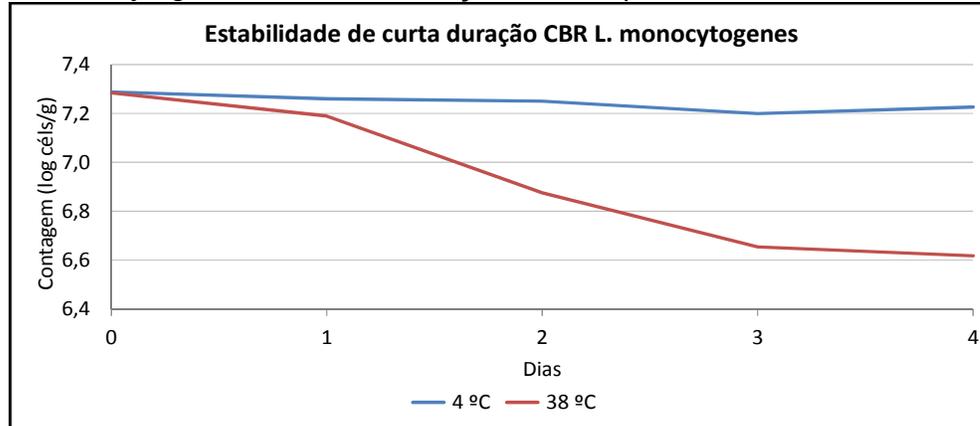
Tabela 28. Análise de resíduos de regressão linear, do CBR de *L. monocytogenes*

Temperatura	Coefficiente Angular	Erro do coef. Angular (sb)	t	sb x t	b	Resultado
4 °C	0,018759	0,006878	3,182446	0,021888	0,018759	Estável
38 °C	-0,186713	0,025948	3,182446	0,082578	0,186713	Instável

Fonte: Do autor, 2016.

t – t de Student.

Figura 15 - Variação da concentração diária de células do CBR *L. monocytogenes* durante simulação de transporte a 4 e a 38 °C



Fonte: Do autor, 2016.

Com conclusões semelhantes às retiradas neste estudo Rosas et al (2010) indicaram a estabilidade de um MR de *Salmonella* liofilizado em matriz leite (skim milk) a 4 °C, e a redução significativa do número de células em temperaturas de 25 e 37 °C, durante sete dias de exposição.

Resultados não concordantes com os dados deste estudo foram reportados por Brandão et al (2013a) para lotes de *E. coli* liofilizados em matriz leite suplementado com diferentes crioprotetores: skim milk a 10%, skim milk a 10%

com 100 mM de sacarose e skim milk a 10% com 100 mM de trealose. Foi observada a estabilidade dos lotes por cinco dias a 4, 25 e 35 °C em todas as temperaturas estudadas.

4.4 Identificação e caracterização molecular dos CBR

Na sequência, são apresentados os resultados de controles aplicados aos CBR a fim de atender os requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012, documento vigente no momento do estudo, complementado pelos requisitos da NIT-DICLA 61:2012 referentes à verificação da identidade microbiológica dos MR, da manutenção das características fenotípicas e da integridade dos genomas.

Oito unidades de cada um dos lotes de CBR de *E. coli* e de *L. monocytogenes* foram selecionadas aleatoriamente e submetidos aos testes de identificação e caracterização molecular. Para a análise do CBR de *S. Typhimurium*, subdividido em dois sub-lotes foram selecionadas aleatoriamente oito unidades do CBR, contemplando quatro unidades de cada sub-lote.

4.4.1 Identificação Fenotípica dos CBR

O controle da identificação fenotípica realizado no equipamento VITEK com oito unidades do lote CBR de *S. Typhimurium* e com as cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 identificou sete unidades do lote e as cepas de referência com scores de “excelente identificação” (nível de confiança de 99%). Uma unidade do lote foi identificada com score de “muito boa identificação” (nível de confiança de 93%). Esta última unidade apresentou resultado positivo para a ação da urease, sendo o resultado apontado pelo sistema VITEK como “resultado que contradiz ao perfil biológico típico da *Salmonella*”. O referido teste foi repetido pelo método convencional que revelou resultado negativo para o teste da urease.

Oito unidades do lote de CBR de *E. coli*, juntamente com as cepas de referência *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536 foram analisadas em equipamento VITEK. Os resultados indicaram a identificação de todas as unidades do lote e das cepas de referência como *E. coli*, com nível de confiança de 96 a 99% e com scores de “excelente identificação”.

A avaliação fenotípica das oito unidades do CBR de *L. monocytogenes* e das cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751 foi realizada através do uso do kit Api Listeria, que gerou o código de identificação “6.5.1.0” para as unidades do lote. O mesmo código de identificação foi obtido no início do estudo para o isolado utilizado no desenvolvimento do lote, com nível de confiança de 98,9%. O teste complementar da hemólise foi também realizado e os resultados demonstraram a formação de halo de β hemólise fraca, típico da espécie *L. monocytogenes*.

Assim, as identificações fenotípicas dos lotes de CBR foram confirmadas. O detalhamento das características fenotípicas de um representante de cada um dos CBR encontram-se no Anexo B.

4.4.2 Identificação Genotípica dos CBR

A identidade genotípica dos CBR foi confirmada através da PCR com a utilização dos mesmos iniciadores utilizados na identificação genotípica dos isolados (item 3.4).

Oito unidades do lote CBR *S. Typhimurium*, o isolado utilizado no preparo do lote (SALM 16) e as cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentaram o mesmo perfil de bandas na amplificação do gene STM 4497, com fragmento de 310 pb.

As oito unidades do lote CBR de *E. coli*, juntamente com o isolado utilizado no preparo do lote (EC 84) e as cepas de referência *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536 apresentaram perfil de bandas semelhantes na amplificação do gene *uspA* com fragmentos de 884 pb. As unidades do CBR de *L. monocytogenes*, o isolado utilizado no preparo do lote (LIST 12) e as cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751 foram também identificadas pelos genes alvo *inlAB*, com fragmentos de 902 pb, respectivamente.

4.4.3 Caracterização Molecular dos CBR pelo Método MLST

Apesar dos procedimentos aplicados na produção e preservação dos CBR não oferecerem riscos de mutações às células, a caracterização dos MRC pelo

MLST foi importante para a confirmação da manutenção da integridade dos sete genes avaliados na primeira etapa do estudo.

O estudo aplicado às oito unidades de cada um dos lotes e no caso do CBR de *Salmonella* das quatro unidades de cada sub-lote, revelou a permanência da numeração de alelos, obtidas anteriormente para as estirpes utilizadas na produção dos CBR (Tabelas 29, 30 e 31).

Tabela 29 - Perfil de alelos no MLST do CRB *S. Typhimurium*

CRB	Genes MLST							ST	eBG
	<i>aroC</i>	<i>dnaH</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>		
<i>S. Typhimurium</i>	10	7	12	9	5	9	2	19	1

Fonte: Do autor, 2017.

Tabela 30 - Perfil de alelos no MLST do CRB *E. coli*

CRB	Genes MLST							ST	CC
	<i>adK</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>puA</i>	<i>recA</i>		
<i>E. coli</i>	6	11	15	16	11	26	6	160	ND

Fonte: Do autor, 2017.

ND- Não definido

Tabela 31 - Perfil de alelos no MLST do CRB *L. monocytogenes*

CRB	Genes MLST							ST	CC
	<i>abcZ</i>	<i>bglA</i>	<i>cat</i>	<i>dapE</i>	<i>dat</i>	<i>ldh</i>	<i>lhk</i>		
<i>L. monocytogenes</i>	7	6	10	6	1	2	1	11	11

Fonte: Do autor, 2017.

4.4.4 Caracterização Molecular dos CBR pelo Método da ERIC-PCR

A reação da ERIC-PCR com a utilização do primer ERIC 1 não demonstrou poder discriminatório e reprodutibilidade entre as linhagens estudadas. O padrão de bandas obtido com o primer ERIC 1 produziu um número de bandas inferior ao encontrado com a utilização do primer ERIC 2, que proporcionou resultados com boa reprodutibilidade. Desta forma, o primer ERIC 2 foi selecionado e empregado na avaliação dos três CBR.

Foram verificados diferentes perfis de bandas na análise das cepas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536 na comparação com o isolado EC84 utilizado no preparo do CBR de *E. coli* e as unidades do lote. Da mesma forma, as cepas *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes*

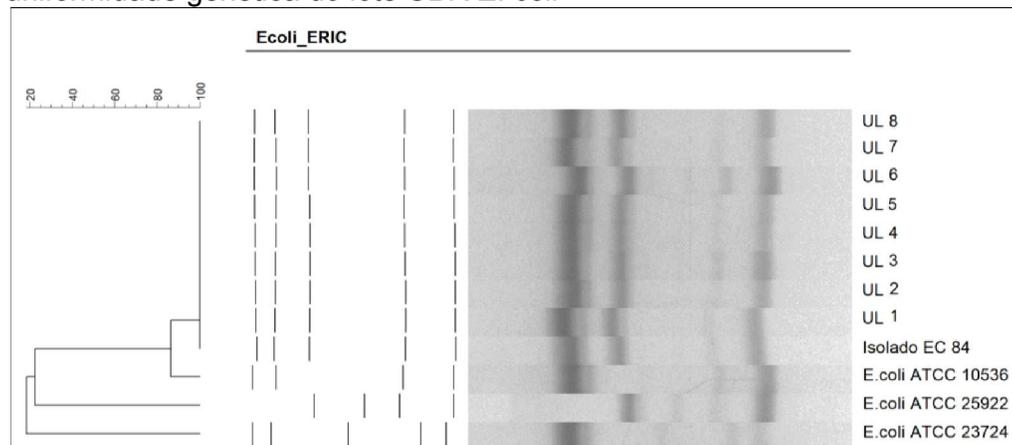
ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751 apresentaram diferentes perfis de bandas com o isolado LIST 12 selecionado para o desenvolvimento do CBR de *L. monocytogenes* e as unidades do CBR. A similaridade entre os perfis de bandas das unidades dos CBR com os isolados selecionados para o preparo de cada um dos lotes, evidenciou a estabilidade e uniformidade genômica entre as estirpes utilizadas para o preparo dos CBR e as oito unidades de cada lote produzido.

As Figuras 16, 17 e 18 exibem os dendrogramas, com a representação dos *fingerprints* obtidos na análise da ERIC-PCR 2.

No caso do CBR de *S. Typhimurium* a análise pela ERIC-PCR 2, apesar de ter demonstrado a estabilidade e uniformidade genômica entre o isolado SALM 16 e as oito unidades do lote, não indicou diferenciação no perfil de bandas, entre as cepas de referência utilizadas e o isolado SALM 16.

Foi então realizado o método da RAPD testando-se três diferentes iniciadores. O primer OPA3 apresentou maior capacidade na produção de fragmentos. A utilização do OPA3 possibilitou a diferenciação entre as cepas *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Typhimurium* 14028 e o isolado SALM 16, como também confirmou perfis iguais entre o isolado SALM 16 e as unidades do CBR *S. Typhimurium*. A Figura 19 apresenta o dendrograma da RAPD obtido, com a avaliação das estirpes de *Salmonella* estudadas.

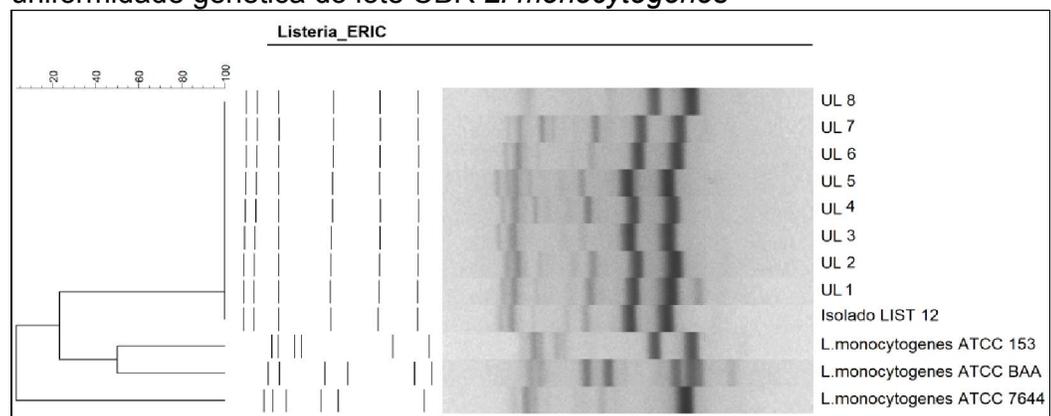
Figura 16 - Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR *E. coli*



Fonte: Do autor, 2018.

UL- Unidade do lote produzido.

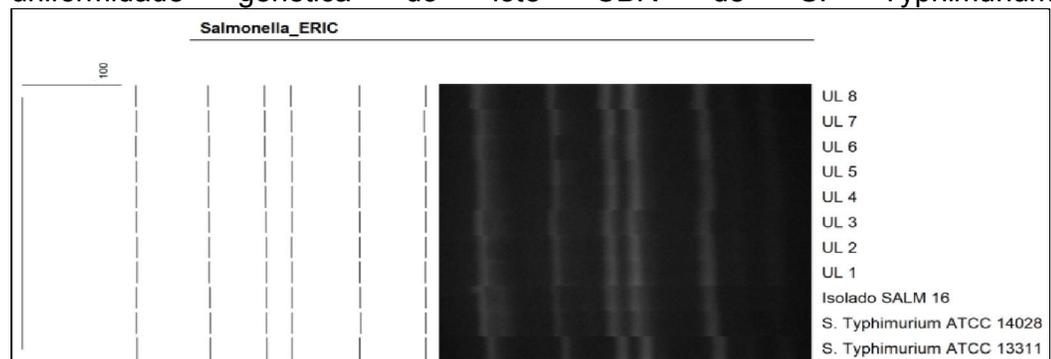
Figura 17 - Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR *L. monocytogenes*



Fonte: Do autor, 2018.

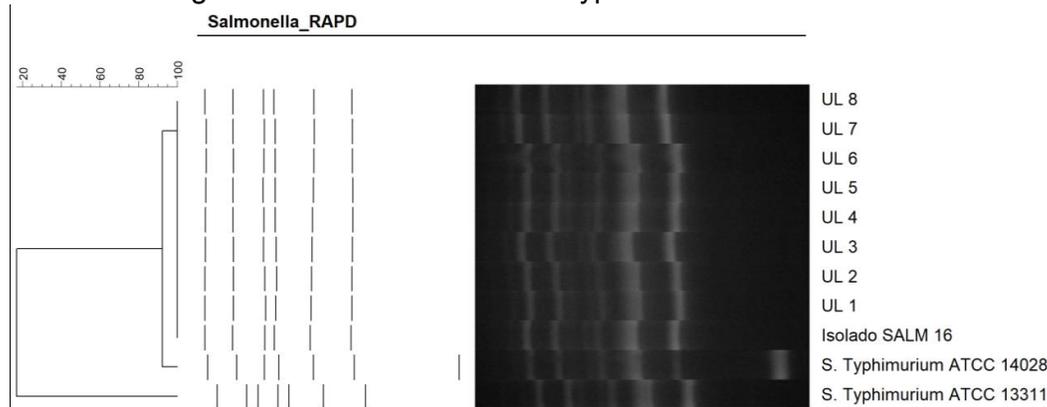
UL- Unidade do lote produzido.

Figura 18 - Perfil de bandas representativo da ERIC2-PCR no estudo da uniformidade genética do lote CBR de *S. Typhimurium*



Fonte: Do autor, 2018.

Figura 19 Perfil de bandas representativo da RAPD no estudo da uniformidade genética do lote CBR de *S. Typhimurium*



Fonte: Do autor, 2018.

A ERIC-PCR foi considerada uma ferramenta de tipificação eficiente, rápida e adequada para a verificação de possíveis alterações genéticas entre os representantes dos grupos de MR de *E. coli* e *L. monocytogenes*. Produziu padrões de bandas diferenciados e pôde ser usada com um número relativamente grande de cepas, sem gerar custos elevados. No entanto não diferenciou cepas de *S. Typhimurium* possivelmente por todas pertencerem ao mesmo sorovar.

A capacidade reprodutível e discriminatória da ERIC-PCR foi anteriormente descrita em estudos que utilizaram a metodologia na diferenciação de estirpes dentro das espécies: *Salmonella enterica*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (JERSEK et al, 1999, LIM et al, 2005, WILSON; SHARP, 2006, FENDRI et al, 2013, MORENO et al, 2013).

Com relação a RAPD, outros autores obtiveram bons resultados na aplicação da técnica na diferenciação de isolados relacionados a uma mesma espécie ou a um mesmo sorovar (MARIPANDI et al, 2007, QUINTAES et al, 2004, TADDELE et al, 2011).

4.5 Estudo colaborativo para acompanhamento do uso dos CBR

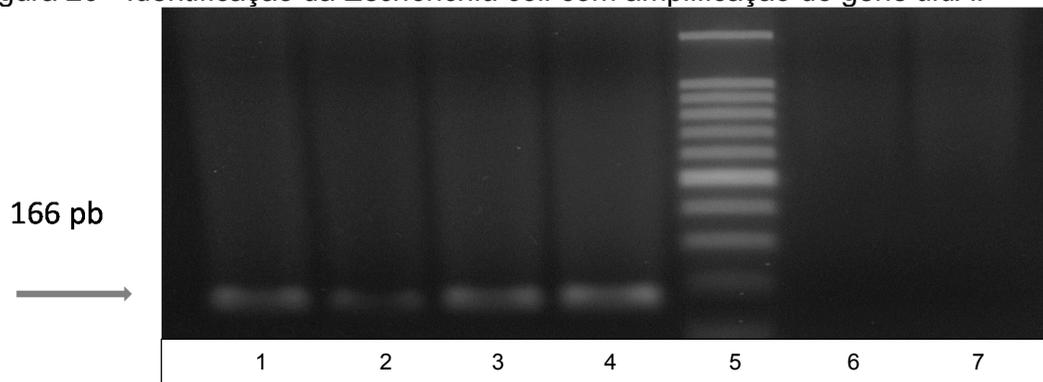
O estudo para o acompanhamento do uso dos CBR contou com a colaboração de dois LACEN que realizam atividades de controle microbiológico de águas e alimentos. Os laboratórios foram orientados a utilizar os materiais como controle interno nos ensaios de rotina e a preencher os formulários de resultados (Apêndice C), enviados juntamente com os materiais.

Os dados das avaliações emitidas pelos laboratórios demonstraram que a utilização dos MR de *Salmonella* e de *L. monocytogenes* como controle interno na rotina de ensaios foi satisfatória. O MR de *E. coli* foi empregado como controle interno de metodologias para análise de alimentos e águas. O MR foi considerado satisfatório como controle positivo das metodologias de análise de alimentos. No entanto, na análise de água, o material foi empregado pelos dois laboratórios, como controle da metodologia que utiliza o substrato enzimático 4-metillumbelifril β -D-glicuronídeo (MUG) e se baseia na ação da enzima β -D-glicuronidase. O controle fenotípico do CBR pelo equipamento VITEK, havia indicado o material como fraco negativo para a atividade da enzima β -D-glicuronidase. Desta forma, o material não apresentou perfil adequado como controle positivo no ensaio do MUG.

A β -D-glicuronidase é uma enzima indutível codificada pelo gene *uidA* na espécie *E. coli*. Cerca de 94% das estirpes de *E. coli*, produzem β -D-glicuronidase (FENG et al, 1991). Entretanto, a expressão da atividade desta enzima é afetada pela repressão de catabólitos. Assim, algumas *E. coli* são β -D-glicuronidase negativas, embora carregem o gene *uidA* (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002). A presença de *E. coli* β -glicuronidase negativa, coincidentes aos resultados deste estudo, tem sido reportada por alguns autores (LECLERCQ et al, 2001, PERIN et al, 2010).

Com o resultado negativo para o teste da β -D-glicuronidase, foi realizada a amplificação da região do gene *uidA* que codifica a enzima, a fim de se confirmar a presença do gene no genoma bacteriano. Os produtos da PCR geraram fragmentos de bandas de 166 pb (Figura 20).

Figura 20 - Identificação da *Escherichia coli* com amplificação do gene *uidA*.



Fonte: Do autor, 2018.

Linha 1: *E. coli* ATCC 25922; linha 2: *E. coli* ATCC 23724; linha 3: *E. coli* ATCC 10536; linha 4: unidade do CBR de *E. coli*; linha 5: peso molecular de 100pb; linha 6: *E. aerogenes* ATCC 13048; linha 7: *K. pneumoniae* ATCC 13883.

Diante deste resultado, foi verificada a necessidade de se evidenciar, durante a elaboração do certificado do material de referência, a informação do mesmo não ser adequado como controle positivo para ensaios que se baseiam na hidrólise do substrato MUG, por não expressar a enzima β -D-Glicuronidase.

4.6 Caracterização molecular adicional dos cbr pelo sequenciamento de genes espécie específicos

Foi realizado o sequenciamento de DNA dos produtos de amplificação dos genes espécies específicos utilizados na identificação genotípica do estudo, de modo a evidenciar a autenticidade dos materiais. Para o CBR *S. Typhimurium* foi utilizado uma unidade selecionada entre os dois sub-lotes do CBR de *S. Typhimurium*, no qual foi realizado o sequenciamento de um fragmento do gene STM 4497. Para a unidade do CBR de *E. coli* a reação de sequenciamento com o fragmento do gene *uspA* e para o CBR de *L. monocytogenes* sequenciamento do gene *inlAB*.

A partir da utilização do BLAST, foi comparada a sequência dos nucleotídeos com as sequências do *GenBank database* e calculada a significância estatística das correlações. As sequências depositadas no *GenBank* ainda não foram disponibilizadas, mas receberam os seguintes números de acesso: *Salmonella* gene STM 4497 (MG924931) e *Listeria* gene *inlAB* (MG924932). O resultado de similaridade dos alinhamentos das sequências dos

CBR no *GenBank* indicou 99% de similaridades para o gene STM 4497 da *Salmonella* e 99% para o gene *inlAB* da *L. monocytogenes*. Para o gene *uspA* foi obtida similaridade de 92%, indicando possível falha no sequenciamento. Um novo sequenciamento foi realizado, e também apresentou baixa similaridade. No cromatograma obtido no sequenciamento, que indica a ordenação dos nucleotídeos, foram verificados picos sobrepostos sugerindo contaminação da sequência estudada. Um novo sequenciamento será reproduzido, usando novos iniciadores da reação de PCR do gene *uspA*.

As sequências dos genes STM 4497 e *inlAB* utilizadas na pesquisa no *GenBank*, definidas no modo FASTA, encontram-se expressas abaixo:

>*S_Typhimurium_STM4497*

```
AAAGCTAATATTTGATATCCTGCTCAGAATGAGCTGCAGGTGCGTGAACA
CCTGAAGTATCTGTTGCGTAATCTGGAAAAGGACCACAAGTTCGCGCACC
TCAACATCTTTCAGATCATCGTCGACATGCTCACTGAACGTGGGTTATTT
GACCGCGTCTGTCAGCAGGAAGTAAAAGTCGGTACCGAAGCGCTGAAAAA
ACAACCTCGTTGGCTTATTGAATCAGAAAAAGATCGCGGATTACATAGCAA
AAAAAGTCGATCTTCAGAATCAAGAGTTTGTCAAGAAGTGAGTGCCCCC
TTAATAGTGAAGATAAAATTTGGTGGCGTTACGGGCATAGTTTTGCCCGC
TTGAGTATAGAATAATGTTTTGCATGATCCTTGTTTTGTTGTATCTCATT
TTCATTATGATTTCTATTTACCCCCGGAGATTGATGAAAGAATTTGGGC
GGTTTGGG
```

>*L_monocytogenes_inlAB*

```
CCTCCGCATGGAGTGCATACTTGACATTTAACACAAATAAATTTTCAGCA
ATAATCAACTTACGGACATAACGCCATTTAAATATTTAACTAAGTTAGTT
GATATTTTGATGAATAATAATCAATTAGCAGATATAACTCCGCTAGCTAA
TTTGACGAATCTAACTGGTTTGACTTTGTTCAACAATCAGATAACGGATA
TAGACCCGCTTAAAAATCTAACAAATTTAAATCGGCTAGAACTATCCAGT
AACACGATTAGTGATATTAGTGCGCTTTCAGGTTTAACTAGTCTACAGCA
ATTATCTTTTGGTAATCAAGTGACAGATTTAAAACCATTAGCTAATTTAA
CAACACTAGAACGACTAGATATTTCAAGTAATAAGGTGTCGGATATTAGT
GTTCTGGCTAAATTAACCAATTTAGAAAGTCTTATCGCTACTAACAACCA
AATAAGTGATATAACTCCACTTGGGATTTTAAACAAATTTGGACGAATTAT
CCTTAAATGGTAACCGATTTAAAGATATAGGCACATTGGCGAGTTTAAAC
AACCTTACAGATTTAGATTTAGCAAATAACCAATTTAGTAATCTAGCACC
ACTGTCGGGTCTAACAAAATAACTGAGTTAAAACCTTGAGCTAACCAAA
TAAGTAACATCAGTCCCCTAGCAGTTTAAACCGCACTCACTAACTTAGAG
CTTAATGAAAATCAGCTGGAAGATATTAGCCCAATTTCTAACCTGAAAAA
TCTCACATATTTAACTTTGTACTTTAATAATATAAGTGATATAAGCCCAG
TTTCTAGTTTAAACAAAGCTTCAAAGATATTTTTCTATAATAACAAGGTAA
GTGACGACTTCCTTTTCGGCAAAAAA
```

4.7 Certificação dos CBR

4.7.1 Certificação Quantitativa do CBR *E. coli*

Somente o CBR de *E. coli*, foi submetido a caracterização quantitativa, baseado na concentração de células em UFC.mL⁻¹. Foi calculada a incerteza combinada, obtida através da soma das incertezas da caracterização quantitativa, homogeneidade e da estabilidade, que contribuem significativamente para a incerteza associada ao valor atribuído ao mensurando. A incerteza combinada serviu de base para o cálculo da incerteza expandida.

Não foram realizadas as certificações quantitativas dos CBR de *S. Typhimurium* e de *L. monocytogenes*, uma vez que o objetivo do estudo foi de produzir materiais de referência dos referidos grupos bacterianos exclusivamente para controle interno de ensaios qualitativos.

4.7.1.1 Cálculo da Incerteza da Caracterização Quantitativa do CBR *E. coli*

A atribuição do valor de propriedades do CBR de *E. coli* foi calculada a partir dos resultados obtidos no estudo interlaboratorial, realizado por dois diferentes laboratórios que empregaram a mesma metodologia de análise.

Não foi utilizado MRC como controle, uma vez que o único MRC certificado disponível no mundo para *E. coli* "IRMM 351 – *E. coli* O157 (NCTC 12900)" apresenta concentração de células muito reduzida com aproximadamente 4 UFC/esfera. Além disso, o referido MRC foi certificado quantitativamente a partir de ensaio que emprega metodologia e meios de cultura diferenciados dos utilizados no presente estudo.

Os dados foram analisados estatisticamente pela análise da variância (ANOVA), avaliando cada um dos 36 resultados obtidos (Tabela 32).

Tabela 32 – Resultado do estudo interlaboratorial para caracterização do CBR *E. coli*

Laboratório	Amostras	Contagem 1 log [UFC.ml ⁻¹]	Contagem 2 log [UFC.ml ⁻¹]	Média log [UFC.ml ⁻¹]	s	CV
Laboratório 1	Amostra1	6,00	6,00	6,00	0,00	0,00
		6,04	6,23	6,14	0,13	2,18
		6,38	6,34	6,36	0,03	0,42
	Amostra2	6,49	6,41	6,45	0,05	0,84
		6,43	6,43	6,43	0,00	0,00
		6,40	6,38	6,39	0,01	0,20
	Amostra3	6,30	6,32	6,31	0,01	0,24
		6,40	6,40	6,40	0,00	0,00
		6,40	6,36	6,38	0,03	0,40
Laboratório 2	Amostra4	6,34	6,30	6,32	0,03	0,46
		6,28	6,23	6,25	0,03	0,55
		6,11	6,18	6,15	0,04	0,72
	Amostra5	6,26	6,41	6,34	0,11	1,78
		6,28	6,23	6,25	0,03	0,55
		6,34	6,40	6,37	0,04	0,62
	Amostra6	6,26	6,32	6,29	0,05	0,75
		6,30	6,32	6,31	0,01	0,24
		6,28	6,45	6,36	0,12	1,87

Fonte: Do autor, 2018.

Tabela 33 – Valor de referência do estudo interlaboratorial

Média	U valor designado	k (95,45%, n-1)
6,306	0,020	2,073

Fonte: Do autor, 2016.

k: fator de abrangência.

Nenhum resultado encontrado foi aberrante, segundo a metodologia de Grubb's. Foi calculada a incerteza padrão, a partir do desvio padrão pela raiz quadrada de "n". O desvio padrão utilizado foi o de "todos os resultados", sendo "n" o número de resultados totais obtidos.

Com resultado final da caracterização = $(6,31 \pm 0,020) \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$, correspondendo à 0,317%.

4.7.1.2 Cálculo da Contribuição da Incerteza da Homogeneidade do CBR *E. coli*

A análise da variância da ANOVA, realizada para as 40 unidades avaliadas no teste da homogeneidade forneceu os dados descritos na Tabela 34 para o cálculo da incerteza.

Tabela 34 – Dados para o cálculo da incerteza da homogeneidade

Média dentro das unidades (MQ_{dentro})	0,01128518
Média entre as unidades (MQ_{entre})	0,0231196
Média da homogeneidade	6,12
$u_{homogeneidade}$ (n=2)	0,077

Fonte: Do autor, 2018.

Resultado final da homogeneidade: $(6,120 \pm 0,077) \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, correspondendo à 1,26 %.

4.7.1.3 Cálculo da Incerteza da Estabilidade do CBR *E. coli*

Na realização do cálculo da incerteza da estabilidade de longa duração foi empregado o erro do coeficiente angular gerado na análise da regressão linear, para a temperatura de referência (-70 °C) pelo número de dias de estudo, como descrito na Tabela 35.

Tabela 35 – Dados para o cálculo da estabilidade de longa duração

Estabilidade de longa	
Erro do coeficiente angular gerado na análise da regressão linear (-70 °C)	0,000177
Dias de estudo	356
$u_{estabilidade \text{ de Longa}}$	0,063

Fonte: Do autor, 2018.

Resultado final da estabilidade de longa duração: $(6,164 \pm 0,063) \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$, correspondendo à 1,02%.

No cálculo da incerteza da estabilidade de curta duração foi utilizado o erro do coeficiente angular, gerado na análise da regressão linear, na temperatura de 4 °C nos quatro dias de estudo, representando a condição máxima de transporte avaliada, em que o material permaneceu estável (Tabela 36).

Tabela 36 – Dados para o cálculo da estabilidade de curta duração

Estabilidade de curta	
Erro do coeficiente angular gerado na análise da regressão linear (4 °C)	0,01357
Dias de estudo	4
$U_{\text{estabilidade de Curta}}$	0,054

Fonte: Do autor, 2016.

Resultado final da estabilidade de curta duração: $(6,075 \pm 0,054) \log_{10}$ UFC.mL⁻¹, correspondendo à 0,89%.

4.7.1.4 Incerteza Combinada do CBR de *E. coli*

A incerteza combinada do CBR *E. coli* foi obtida pela soma das incertezas associadas:

$$U_{(\text{MRC})} = 0,115013613 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$$

Considerando um fator de abrangência de aproximadamente 95%, teremos $k = 2$ e a incerteza expandida será:

$$U_{(\text{CBR})} = 0,230027226 \log_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$$

Assim, o foi valor de referência da concentração de células calculado para a certificação quantitativa do CBR de *E. coli* foi de $(6,31 \pm 0,23) \log_{10}$ UFC/mL⁻¹.

4.7.2 Certificação Qualitativa dos CBR

A Tabela 37 apresenta os valores de referência e os graus de confiança obtidos nos controles realizados com os lotes de CBR estudados. As certificação dos CBR foi realizada a partir dos resultados das análises fenotípicas, identificações genotípicas e das caracterizações moleculares de cada um dos lotes, seguidos os níveis de confiabilidade das metodologias, quando declarados.

Com relação ao CBR de *E. coli*, o resultado do sequenciamento do gene *uspA* foi considerado baixo, para o propósito de verificação da autenticidade do

material. Desta forma, o CBR de *E. coli* não foi certificado, apesar dos cálculos de certificação quantitativa terem sido realizados.

Os certificados dos materiais de referência de *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* são apresentados no Apêndice D.

Tabela 37 – Valores de referência (V_{ref}) e graus de confiança dos CBR

Micro-organismo	Identificação fenotípica	Identificação genotípica	Caracterização molecular		
	Vitek 2.0 / API Listeria	PCR	MLST	ERIC-PCR	Sequenciamento de DNA
<i>S. Typhimurium</i>	identificação satisfatória Grau de confiança de 93 a 99%	amplificação do gene STM 4497 com 310 pb	<i>aroC</i> 10; <i>dnaN</i> 07; <i>hemD</i> 12; <i>hisD</i> 11; <i>purE</i> 05; <i>sucA</i> 09; <i>thrA</i> 02 *Tipo sequencial 19 e eBurst Groups 01	perfil de 6 bandas entre 400 a 1600 pb	análise da sequência de DNA que codifica a região do gene STM 4497 Grau de confiança de 99%
<i>E. coli</i>	identificação satisfatória Grau de confiança de 96 a 99%	amplificação do gene <i>uspA</i> com 884 pb	<i>adK</i> 06; <i>fumC</i> 06; <i>gyrB</i> 15; <i>icd</i> 16; <i>mdh</i> 11; <i>purA</i> 26; <i>recA</i> 06 *Tipo sequencial 160 Complexo Clonal não definido	perfil de 3 bandas entre 700 a 1100 pb	análise da sequência de DNA que codifica a região do gene <i>uspA</i> Grau de confiança de 92%
<i>L. monocytogenes</i>	identificação satisfatória Grau de confiança de 98,9%	amplificação do gene <i>inlAB</i> com 902 pb	<i>abcZ</i> 07; <i>bglA</i> 06; <i>cat</i> 10; <i>dapE</i> 06; <i>dat</i> 01; <i>ldh</i> 02; <i>lhkA</i> 01 *Tipo sequencial 11 e Complexo Clonal 11	perfil de 4 bandas entre 800 a 1500 pb	análise da sequência de DNA que codifica a região do gene <i>inlAB</i> Grau de confiança de 99%

Fonte: Do autor, 2018.

Os materiais foram desenvolvidos seguindo as exigências de produção e caracterização das normas: ABNT NBR ISO 17034:2017, ISO GUIA 35:2012 e da NIT-DICLA 61:2012.

Um ponto de extrema relevância verificado foi relacionado à dificuldade de se obter informações, na literatura científica, sobre os níveis de confiabilidade dos métodos de identificação genotípica e moleculares utilizados na etapa de caracterização dos materiais. No entanto, o sequenciamento dos genes espécie específicos e a comparação com depósitos do NCBI garantiram a autenticidade dos MR com níveis de confiabilidade elevados.

A problemática de se assegurar a rastreabilidade metrológica na certificação de materiais biológicos foi abordada por Pereira (2017). Dos poucos MRC biológicos disponíveis no mundo, raros são os provedores que apresentam informações que assegurem a rastreabilidade dos materiais.

Dentre os provedores de materiais de referência microbiológicos, o IRMM é o único que divulga as formas de controle dos materiais de referência certificados produzidos. No escopo de MRC microbiológicos disponibilizados pelo IRMM, caracterizados quantitativamente e em nível molecular, encontram-se os materiais de *S. Typhimurium* (BAETS et al, 2008a), *E. coli* O157 (BAETS et al, 2008b), *Candida albicans* (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009b) e *Enterococcus faecalis* (BAETS; MEEUS; SCHIMMEL, 2009c). Nos relatórios de certificação do IRMM são descritos, além da avaliação da homogeneidade e da estabilidade, a forma de caracterização quantitativa realizada por estudos interlaboratoriais, empregando-se métodos de contagens baseados no número de UFC/esferas. A caracterização molecular dos MR desenvolvidos pelo IRMM tem sido realizada a partir de análises da sequência de genes espécie específicos, com posterior comparação com sequências de bancos de dados, coincidente com a prática de sequenciamento utilizada no presente estudo.

Desta forma, ao compararmos os controles aplicados neste trabalho, pioneiro no país, com os utilizados pelo IRMM que tem seus produtos reconhecidos e comercializados nos países da Europa e do mundo, podemos inferir que os procedimentos utilizados para a caracterização dos materiais desenvolvidos foram adequados, considerando a aplicabilidade como cepas de referência certificadas. Para novos materiais a serem produzidos, protocolos reduzidos de controle que atendam as exigências da NIT-DICLA 61:2012 poderão ser avaliados.

Com a perspectiva da disponibilização das cepas de referência produzidas neste e em futuros estudos, cabe destacar, a necessidade da aprovação e reconhecimento dos materiais produzidos, pela organização de acreditação oficial do país. O Inmetro, através da verificação da conformidade das atividades de produção, controle e certificação, dará maior confiabilidade a esses materiais.

5 CONCLUSÕES

- A utilização da metodologia do MLST permitiu determinar a diversidade genética das estirpes de *Salmonella* estudadas e inferir o ST 19 (eBG 1) como o circulante no país. Foi evidenciada a presença de uma estirpe classificada como ST 313, isolada de um surto de DTA ocorrido na região Sul do país. Foi também identificado um possível novo alelo entre os isolados estudados.
- A análise do MLST indicou uma alta variedade genética entre as estirpes de *E. coli* avaliadas, com a determinação de seis ST, para seis estirpes distintas. Foram identificados cinco possíveis novos alelos e seis possíveis novos ST.
- O estudo do MLST de *L. monocytogenes* classificou as 16 estirpes em sete ST, com oito isolados associados a um mesmo ST 155 (CC 155), revelando uma alta clonalidade entre eles. Todas as cepas de referência apresentaram ST diferentes entre si e entre os isolados. A análise identificou três ST entre os isolados (155, 121 e 8), que são clonais em outras regiões do mundo. Apesar da clonalidade observada, não há relação filogenética evidente entre os isolados.
- Foi selecionada a estirpe SALM 16 a partir das informações obtidas no MALDI-TOF classificada como ST 19 (eBG 1) pelo MLST. Foi também selecionada a estirpe LIST 12 associada ao ST 11 (CC 11) no MLST. A estirpe de *E. coli* selecionada EC 84 foi agrupada pelo MLST no ST 160 (CC não definido).
- Os sub-lotes dos CBR de *E. coli* e *L. monocytogenes* foram considerados homogêneos. Já os sub-lotes de *Salmonella* foram identificados como não homogêneos, ficando estabelecida a verificação da estabilidade para cada um dos sub-lotes de *Salmonella*, separadamente.
- Os lotes de CBR de *E. coli* e *L. monocytogenes* e os sub-lotes de *Salmonella* foram todos estáveis na temperatura de referência a -70 °C durante o período aproximado de um ano de estudo. No estudo da temperatura de armazenamento

a -20 °C o CBR de *L. monocytogenes* e o sub-lote 1 do CBR de *Salmonella* foram estáveis até o período de 165 e 225 dias, respectivamente.

- O estudo da estabilidade de curta duração indicou a temperatura de 4 °C como adequada para o transporte dos três materiais durante quatro dias.
- A uniformidade genômica dentro dos lotes foi verificada através da metodologia da ERIC-PCR.
- A autenticidade dos materiais foi garantida através da caracterização das sequências de DNA dos produtos de amplificação de genes que codificam características específicas.
- Foi realizada a certificação dos lotes de *Salmonella* e *L. monocytogenes*. O lote CBR de *E. coli* não apresentou resultado satisfatório na caracterização molecular pelo sequenciamento, o que inviabilizou a certificação do material.
- Os materiais certificados desenvolvidos neste estudo consistem nas primeiras bactérias de referência certificadas produzidas no Brasil e reúnem os requisitos de um material de referência estabelecidos pela norma ABNT NBR ISO 17034:2016. Os parâmetros homogeneidade, estabilidade e caracterização foram cumpridos e relacionados nos certificados que acompanharão os materiais.
- Com relação às diretrizes da norma NIT-DICLA 061:2012, pode-se garantir que os materiais certificados produzidos atendem às características de viabilidade, pureza, autenticidade e estabilidade genética, indicados no referido documento.

6 PERSPECTIVAS

- Disponibilizar os MR desenvolvidos para laboratórios brasileiros, com ênfase nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) e outros laboratórios públicos;
- Produzir um novo lote de *E. coli* utilizando uma das estirpes avaliadas no estudo, que atenda a todas as características fenotípicas e genotípicas da espécie;
- Utilizar os procedimentos aplicados no presente estudo para a produção de novas cepas de referência de interesse em Vigilância Sanitária.

REFERÊNCIAS

- AANENSEN, D.M.; SPRATT, B.G. The multilocus sequence typing network: MLST.net. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 728-733, 2005.
- ABDELMASSIH, M. et al. Development and validation of stable reference materials for food microbiology using *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1524-1530, 2011.
- ACHTMAN, M. et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathology**, v. 8, n. 6, 2012.
- ALMEIDA, F. et al. Multilocus sequence typing of *Salmonella* Typhimurium reveals the presence of the highly invasive ST313 in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 51, p. 41–44, 2017.
- AKINYEMI, K.O. et al. Emergence of Third Generation Cephalosporin Resistance and Typing by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) among Clinical *Salmonella* Isolates from Lagos, Nigeria. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 6, p. 668-677, 2014.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, D.C.: APHA, 2001.
- _____. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed. Washington, D.C.: APHA, 2012.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Reference Strains: how many passages are too many? **Tech Bulletin**. v. 23, n. 2, p. 6-7, 2003. Disponível em: <<https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb06.ashx>>. Acesso em: may 2017.
- ANASTASI, E.M. et al. Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 5882–5886, 2010.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>>. Acesso em: 27 de outubro de 2017.

ARDAKANI, M.A.; RANJBAR, R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. **Electronic Physician**, v. 8, n. 4, p. 2291-6, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 30**: materiais de referência - termos e definições relacionados. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

_____. **ABNT ISO GUIA 34**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2012a.

_____. **ABNT ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012b.

_____. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017a.

_____. **ABNT NBR ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017b.

ASHTON, P.M. et al. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome Sequencing. **Peer Journal**, p. 1-18, 2016.

AZEVEDO, R.M.M.C.; JORGE, K.; AZEREDO, D.R.P. Evolução do conceito de segurança alimentar. In: AZEREDO, D.R.P. **Inocuidade dos alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

BADARÓ, A.C.L.; AZEREDO, R.M.C.; ALMEIDA, M.E.F. Vigilância sanitária de alimentos: uma revisão. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, v. 1, n. 1, 2007.

BAETS, D.L. et al. **Certification of a reference material with *Salmonella enteritidis* (NCTC 12694) at a level of 5 colony forming units on nutrient agar and 4 colony forming units on xylose lysine deoxycholate agar, IRMM-352**. Belgium: JCR, 2008a

_____. **Certification of a reference material with *Escherichia coli* O157 (NCTC 12900) at a level of 4 colony forming units per material sphere, IRMM-351**. Belgium: JCR, 2008b.

_____. **Certification of a reference material with *Candida albicans* (NCPF 3179) at a target level of 1000 colony forming units per material sphere IRMM-354.** Belgium: JCR, 2009b.

_____. **Certification of a reference material with *Enterococcus faecalis* (CIP 106877) at a target level of 1000 colony forming units per material sphere, IRMM-355.** Belgium: JCR, 2009c.

BAETS, L. et al. First certified reference materials for molecular fingerprinting of two approved probiotic *Bacillus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.129, n.1, p.16-20, 2009a.

BAILEY, D. et al. Use of MALDI-TOF for diagnosis of microbial infections. **Clinical Chemistry**, v. 59, p. 1435–1441, 2013.

BARBOSA, A.V. et al. Characterization of epidemic clones of *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolated from humans and meat products in Brazil. **Journal of Infections in Developing Countries**, v. 9, n. 9, p. 962-969, 2015.

BAM - Bacteriological Analytical Manual. 8th ed., rev. A, 1998. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

BARBUDDHE, S. B. et al. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5402-5407, 2008.

BEJ, A.K. et al. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1013-1017, 1991.

BRADLEY, K.K. et al. Epidemiology of a large restaurant-associated outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:NM. **Epidemiological Infection**, v.140, p. 1644-1654, 2012.

BRANDÃO, M.L.L. et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 2, p. 144-150, 2013a.

_____. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo *Listeria monocytogenes* em matriz queijo. **Revista Ciencia Rural**, v. 43, n. 10, p. 1905-1910, 2013b.

_____. Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leite. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 1, p. 39-45, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62, 26 ago. 2003. Regulamentos Técnicos – Oficializa os métodos analíticos oficiais microbiológicos para controle dos produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 18/09/2003, n.181, p.14, Seção1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos**. 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: nov. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Laboratórios Centrais de Saúde Pública. Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. SISLAB – Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN). Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/sistema-nacional-de-laboratorios-de-saude-publica-sislab>. Acesso em: mar. 2018.

_____. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União** nº 239, de 14 de dez. 2011, Seção 1, página 39/46.

_____. Portaria de Consolidação Nº 05, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União** nº 190, de 03 de out. 2017.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n.7-E, p.45, 10 jan. 2001. Seção 1.

_____. Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS 5309-1: methods for sampling chemical products** – part 1: introduction and general principles. Reino Unido, 1976.

BROOKS, J.T. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. **Journal of Infectious Disease**, v. 192, p. 1422–1429, 2005.

CAMARÓ-SALA, M.L. et al. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 7, p. 31-36, 2015.

CANHOS, V.P. et al. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Culturas de Microrganismos. **Microbiologia in foco**, São Paulo, v. 2, p. 40-48, 2007.

CARDOSO, M.H.W.M. **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008, 191 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro, 2008.

CARVALHO, A.S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 835-847, 2004.

CASTRO-ROSAS, J. et al. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 176–180, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe - United States, August-September 2011. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, p. 1357-1358, 2013.

_____. Notes from the field: multistate outbreak of listeriosis linked to soft-ripened cheese - United States, 2013. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 13, p. 294-295, 2014.

_____. Incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture-independent diagnostic

tests on surveillance Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013-2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v. 66, n. 15, p. 397-403, 2017.

CHAURET, C. Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. **Virulence**, v. 2, p. 593–601, 2011.

CHEN, J.; GRIFFITHS, M.W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters Applied Microbiology**, v. 27, p. 369-371, 1998.

CHEN, H.M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, p. 147-152, 2013.

CLARK, A.E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

CLEMENTS, A.I. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87; 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement**. CLSI document M100-S25. Wayne, PA, v. 35, n. 3, 2015.

COOKE, F.J. et al. Characterization of the Genomes of a Diverse Collection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Definitive Phage Type 104. **Journal of Bacteriology**. v. 190, p. 8155–8162, 2008.

COOPER, J.E.; FEIL, E.J. Multilocus Sequence Typing-What is resolved? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 32-47, 2004.

COSTA, J.C.B. et al. Preparo de itens de ensaio de proficiência em matriz queijo para a pesquisa de *Salmonella* spp. **Revista Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, n. 3, p.11-18, 2015.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 26-38, 2010.

CROXEN, M.A. et al. Recent Advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species in: food microbiology. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology**: fundamental and frontiers. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. 1038 p.

DÁVALOS, Y.O.; QUEVEDO, F. **Garantía de calidad de los laboratorios de microbiología alimentaria**. Mexico: Editorial Andrómeda S.A., 1991.

DAY, J.G.; STACEY, G.N. Biobanking. **Molecular Biotechnoogy**, v. 40, n. 2, p. 202-213, 2008.

DE CAROLIS, E. et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Review Article. **The Journal of Infection Developing Countries**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, 2014.

DIECKMANN, R.; MALORNY, B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4136-46, 2011.

DOUMITH, M. et al. Rapid identification of major *Escherichia coli* sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 1, p.160-166, 2015. Disponível em: <<https://enterobase.warwick.ac.uk>>. Acesso em: 04 dez. 2017.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological tests. In: EUROPEAN pharmacopeia 8.8. Strasbourg: Council of Europe, 2016. v.1,

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308-341, 2013.

FARFOUR, E. et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing gram-positive bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 2702-2707, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Métodos biológicos, ensaios biológicos e microbiológicos. In: FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v.1.

FEASEY, N.A. et al. Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **Lancet**, v. 379, p. 2489-99, 2012.

FENDRI, I. et al. Genetic diversity of food-isolated *Salmonella* strains through pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR). **Plos One**, v. 8, n. 12, online, 2013.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. In: **Bacteriological analytical manual online**. FDA, 2002, updated 2017. Chapter 4. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: jan. 2018.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 2011. In: **Bacteriological analytical manual online**. FDA, 2009, updated 2017. Chapter 4A. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: jan. 2018.

FOLEY, S.L. et al. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 582-607, 2013.

FOLEY S.L.; LYNNE A.M.; NAYAK R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection Genetic and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 430-40, 2009.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Coleções de cultura**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br>>. Acesso em: dez. 2017.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2005.

GODAMBE, L.P.; BANDEKAR, J.; SHASHIDHAR, R. Species specific PCR based detection of *Escherichia coli* from Indian foods. **Biotechnology**, v. 7, n. 130, p. 1-5, 2017.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the salmonella serovars**: WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. 9th edition. Geneva: World Health Organization; Institut Pasteur, 2007.

GU, M.B.; CHOI, S.H.; KIM, S.W. Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 2, p. 89-182, 2001.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing. *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. E45–E62, 2007.

HARBOTTLE, H. et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2449-2457, July 2006.

HEIJNEN, L.; MEDEMA, G. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. **Journal of Water and Health**, v. 4, p. 487-498, 2006.

HENDRIKSEN, R.S. et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

HITCHINS, A.D.; JINNEMAN, K.; CHEN, Y. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual online. FDA, 2017. Chapter 10. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>>. Acesso em: 28 set. 2017.

HULTON, C.S.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825-34, 1991.

HSUEH, P.R. et al. Evaluation of the Bruker Biotyper matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. **Journal Clinical Microbiology**, v. 52, p. 2371–2379, 2014.

INSTITUTE PASTEUR MLST AND WHOLE GENOME DATABASE. ***L. monocytogenes***. Disponível em: <<http://bigsd.b.pasteur.fr/>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE. **Microrganismos de Referência**. Disponível em: <<http://www.incqs.fiocruz.br/>>. Acesso: dezembro de 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **NIT-DICLA-61**: requisitos sobre a acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de material de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro, 2012.

_____. **DOQ-CGCRE-078**: orientações gerais para utilização de materiais de referência em ensaios biológicos. Rio de Janeiro: CGCRE, jul. 2015.

INT'VELD, P. H. et al. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 496-504, 1998.

JENNINSON, A.V. et al. Analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure among isolates from 1931 to 2015 in Australia. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 1-3, 2017.

JENSEN, A.K. et al. Molecular typing and epidemiology of human listeriosis cases, Denmark, 2002–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 625-633, 2016.

JERSEK, B. et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 103-109, 1999.

JOHNSON, T.J. et al. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain o1:k1:h7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 8, p. 3228-3236, 2007.

JOLLEY, K.A. et al. Sequence type analysis and recombinational tests (start). **Bioinformatics Applications Note**, v. 17, p. 1230-1231, 2001.

JUNG, Y.S. et al. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 237-241, 2003.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology Journal**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARIUKI, S. et al. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. **Vaccine**, v. 33, n. 3, p. 1-21, 2015.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1687-1829, 2002.

KIM, H.J. et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1653–1661, 2006.

KINGSLEY, R.A. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. **Genome Research**, v. 19, p. 2279-2287, 2009.

KÖHLER, C.D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 642–647, 2011.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, D.C: APHA., chap. 8, p. 69-80 , 2001.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 360, p. 359-361, 1998.

LATORRE, W.C. **Atuação da ANVISA no controle sanitário de alimentos - previsões 2014**: reunião ILSI. São Paulo, 2013. Disponível em: <www.ilsis.org/Brasil/Documents/WilliamLatorre.pdf>. Acesso em: nov. 2014.

LAVIGNE, J.P.; BLANC-POTARD, B. Molecular evolution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and pathogenic *Escherichia coli*: From **Pathogenesis to therapeutics**. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 8, p. 217-226, 2008.

LEAL; N.C. et al. Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and food samples in Brazil. **Jacobs Journal of Microbiology and Pathology**, v. 1, n. 2, p. 1-17, 2015.

LECLERCQ, A. et al. Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1161-1164, 2001.

LESLIE, S.B. et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 10, p. 3592-3597, 1995.

LIM, H. et al. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 411-418, 2005.

LIN, H et al. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. **Int. Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 411-18, 2005.

LIU, D. Molecular Approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic *Listeriae*. Review. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 59-69, 2013.

LOMONACO, S.; NUCERA, D.; FILIPELLO, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infection Genetics and Evolution**, v. 35, p. 172-183, 2015.

LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 03 jan. 2018.

LUCCHESI, G. A. Vigilância Sanitária no Sistema Único de Saúde. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001, Brasília. : **Caderno de textos**: eixo II – texto 5. Brasília: Anvisa, 2001., p. 53-69.

MAIDEN, M.C.J. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MAJOWICZ, S.E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 882-889, 2010.

MARIPANDI, A. et al. Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella enteritidis* isolated from chicken samples. **Biotechnology**, v. 6, p. 278-282, 2007.

MARTINS, I.S. et al. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 9, 2010.

MCLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 15-33, 2004.

MENG, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology**: fundamental and frontiers. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, 1038p.

MORAES, O.M.G. Princípios de garantia da qualidade na otimização das operações analíticas realizadas em laboratórios. In: MARINS, B.R.; TANCREDI, R.C.; GEMAL, A.L. (Org.). **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária**: reflexões e práticas. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014.

MOOIJMAN, K.A. et al. Development of microbiological reference materials. **Rep EUR 14375 EN**. 1992.

MORENO, A.M. et al. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 2, p. 136-144, 2013.

MORGAN, C.A. et al. Preservation of micro-organisms by drying. A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006.

NATARO, J.P. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in BALTIMORE, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402–407, 2006.

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**, v. 139, p. S3–S15, 2010.

NYSTROM, T.; NEIDHARDT, F.C. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3187–3198, 1992.

NODA, T. et al. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 38, 2011.

NOORDHOUT, C.M. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 14, p. 1073–82, 2014.

ODUMERU, J.A.; LEÓN-VELARDE, C.G. *Salmonella* detection methods for food and food ingredients. In B. S. M. Mahmoud (Ed.), *Salmonella – A dangerous foodborne pathogen*. **InTech**, p. 373–392, 2012.

OFICINA SOBRE ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA E PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA NO BRASIL, 2., 15-16 abr. 2008. Rio de Janeiro. **Relatório**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. 15 p.

OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A.I. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 676, p. 1-13, 2017.

OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, p. 503–505, 2010.

OLIVEIRA, A.P. et al. *Salmonella* Enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 16; p. 1947-1972, 2013.

OSEK, J. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 308–311, 2001.

OTTO, T. D. et al. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 861–871, 2008.

PABST, W.L. et al. Prevalence of Enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2289–2293, 2003.

PARK, S.H. et al. Identification of *Salmonella enterica* subspecies, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 301, p. 137–146, 2009.

PARK, S.H.; RICKE, S.C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 152-160, 2014.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.

PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 40, p. 107–113, 2005.

PEREIRA, C.R. **Rastreabilidade metrológica em materiais de referência microbiológicos**: cenário atual e perspectivas futuras. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, INMETRO. 2017.

PERIN, L.M. et al. Glucuronidase activity of *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, 2010.

PETERZ, M. Laboratory performance in a food microbiology proficiency testing scheme. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 210–216, 1992.

- PHILLIPP, W.J. et al. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, p. 134-8, 2007.
- POWER, E.G.M. RAPD typing in microbiology a technical review. **Journal of Hospital Infection**, v. 34, n. 247-265, 1996.
- QUINTAES, B.R. et al. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 143-147, 2004.
- RICHTER, S.S. et al. Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1571-1578, 2013.
- RODRIGUEZ-SIEK, K.E. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, pt. 6, p. 2097-2110, 2005.
- ROSAS, C.O. et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.
- RYCHERT, J. et al. Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 2225–2231, 2013.
- SALCEDO, C. et al. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 757–762, 2003.
- SCHAUMANN, R. Discrimination of *Enterobacteriaceae* and non-fermenting Gram negative bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 118-122, 2013.
- SCHOUG, A. et al. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 –effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties, **Cryobiology**, v. 53, p. 119-127, 2006.

SEITZ, A.E.; PREVOTS, D.R. Molecular epidemiology. In: De FILIPPIS, I.; MCKEE, M.L. *Molecular Typing in Bacterial Infections*. 1 ed. New York: **Springer Science**, 2013, 482p.

SHANMUGASUNDARAM, M. et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fliB*, *iroB*, *invA*, *rfaJ*, *STM2755*, *STM4497* genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 1385–1394, 2009.

SHINOHARA, M. et al. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.

SILVA, Y.; TANCREDI, R.C. Doenças de origem alimentar: integralidade nas ações das vigilâncias responsáveis pelo processo investigativo e controle. In: MARINS, B.R.; TANCREDI, R.C.; GEMAL, A.L. (Orgs.). **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014.

SMITH, D. Culture Collections. In Sima Sariaslani, Geoffrey M. Gadd, editors: **Advances in Applied Microbiology**, v. 79, p. 73-118, Burlington: Academic Press, 2012.

STACEY, G.N.; DAY, J.G. Long-term *ex situ* conservation of biological resources and the role of biological resource centers methods. In: STACEY G.N., DAY, J.G. (Ed.). **Cryopreservation and Freeze-Drying protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2007. p. 1-14.

STREETER, J.G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 484-491, 2003.

SU, L.H.S.; CHIU, C.H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Review Article. **Chang Gung Medical journal**, v. 30, n. 3, p. 210-219, 2007.

SUN, J. et al. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China. **PLoS ONE**. v. 9, n. 11, p. 2007–2011, 2014.

SWAMINATHAN et al. *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**. 3. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, 1038p.

TADDELE, M.H. et al. Epidemiological characterization of *Salmonella gallinarum* isolates of poultry origin in India, employing two pcr based typing methods of RAPD-PCR and PCR-RFLP. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 11, p. 1037-1051, 2011.

TANCREDI, R.C.; FERNANDES, M.L. O poder público na aplicabilidade normativa da segurança alimentar. In: MARINS, B.R.; TANCREDI, R.C.; GEMAL, A.L. (Org.) **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 207–217, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA)- Food Safety and Inspection Service. **Microbiology Laboratory Guide book Online**. USA. 1998. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook/microbiology-laboratory-guidebook>>. Acesso em: nov 2017.

UNITED STATES Pharmacopoeia. Microbiological Tests. In: UNITED STATES Pharmacopoeia 39. National Formulary 34 : 2016. Rockville: U.S. Pharmacopoeia, 2016. v. 1.

VALLIM, D.C. et al. Twenty years of *Listeria* in Brazil: occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International.**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

VAN IWAARDEN, P. **Certification of a reference material of purified genomic DNA from *Listeria monocytogenes* (strain 4B, NCTC 11994). Certified Reference Material IRMM-447, EUR 22107**. EU Commission, 2006.

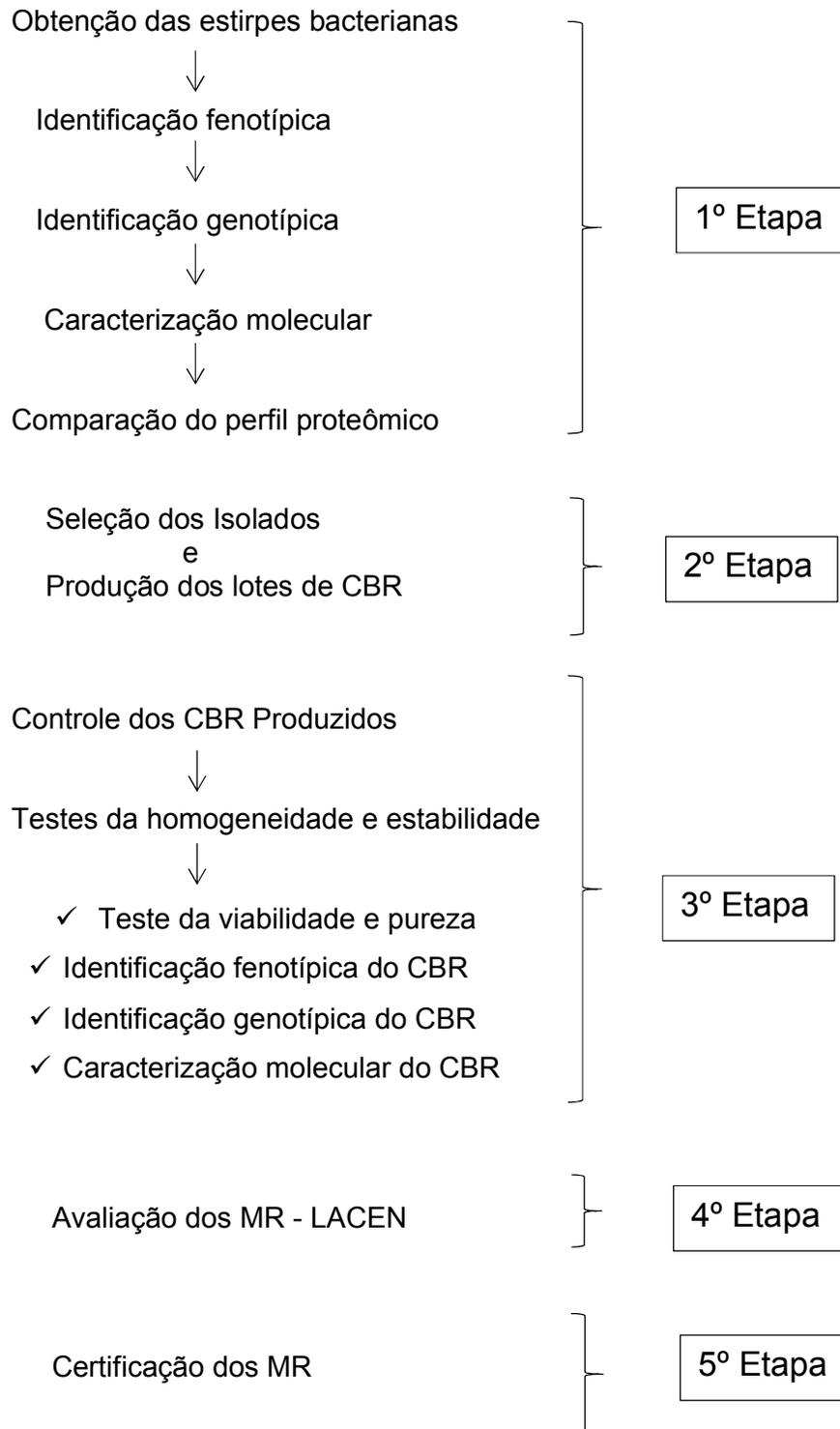
VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.J.; KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900–907, 2010.

- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.
- VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.
- WEISEMANN, J. et al. Generation and characterization of six recombinant botulinum neurotoxins as reference material to serve in an international proficiency test. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5035-5054, 2015.
- WELKER, M.; MOORE, E.R. Applications of whole cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic bacteriology. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 2-11, 2011.
- WESSMAN, P.W. et al. Impacto f matriz proprieties on the survival of freeze-dried bactéria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2518-2528, 2010.
- WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **J AOAC Int**, v. 85, p. 524-531, 2002.
- WILLIAMS, J.G.K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, L.A.; SHARP, P.M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biological Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-1168, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 156516 5. 255 p. Disponível em:
<http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/>.
Acesso: set. 2017.
- WU, C. et al. *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-16, 2015.

YDE, M. et al. Usefulness of the european epidemic intelligence information system in the management of an outbreak of listeriosis, BELGIUM, 2011. **Euro Surveillance**, v. 17, n. 38, 2012.

ZELNY, R. et al. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, p. 241-246, 2015.

APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTUDO



APÊNDICE B - PLANEJAMENTOS DA PRODUÇÃO

PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO:

Lote Candidato a Material de Referência Microbiológico *Salmonella enterica* Typhimurium

1.INTRODUÇÃO

Este documento apresenta as condições de preparo e controle do lote candidato à bactéria de referência (CBR) microbiológico qualitativo de *Salmonella enterica* Typhimurium. Os controles da qualidade que serão aplicados ao CBR visam atender aos requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012 e as orientações da NIT-DICLA 061:2012.

Após a produção e controle será realizada a certificação do material.

2.FINANCIAMENTO

A produção deste material de referência será realizada com recursos do projeto CNPQ/ANVISA – 44012720149 e com a infraestrutura do INCQS.

3.OBJETIVOS

Produzir material de referência (mr) para uso como controle interno de ensaios destinados a laboratórios públicos e privados, que atuam em atividades na área da microbiologia.

4.SUBCONTRATAÇÃO

Foi utilizado o equipamento MALDI-TOF de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, na etapa anterior a produção, quando foi realizada a seleção da cepa empregada no preparo de lote.

Na caracterização molecular do lote serão utilizados os serviços de sequenciamento genético, da plataforma de sequenciamento localizada no Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Os serviços citados são únicos na FIOCRUZ, sendo o uso disponibilizado para a comunidade científica da instituição.

5.COMITÊ TÉCNICO (CT) RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO DO LOTE CANDIDATO A MR

Carla de O. Rosas, Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso, Marcelo Luiz L. Brandão, Marcus Henrique C. de la Cruz, Silvia dos Reis Lopes, Valéria de Mello Medeiros.

6.DISPONIBILIZAÇÃO DO MATERIAL

O material será disponibilizado como bactéria de referência *Salmonella* spp certificada.

Pretende-se que o lote esteja disponível a partir de abril de 2018. Ao ser fornecido, será transportado em condições que atendam aos critérios de transporte de material biológico da *International Air Transport Association* - IATA. Serão considerados os resultados do estudo de estabilidade de curta duração descritos neste documento, para a escolha da temperatura de transporte do MR com segurança.

7.DOCUMENTAÇÃO DO MR

Juntamente com o MR, será fornecida documentação com orientações sobre os procedimentos adequados para o manuseio do material, biossegurança, aplicação apropriada e armazenamento.

Constarão na documentação informações sobre os ensaios de controles e os testes de caracterização aplicados ao material e a validade das informações declaradas.

8. SELEÇÃO DO ISOLADO A SER UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO MR

(Já realizada na 1ª etapa do estudo, antes da elaboração do planejamento de produção).

Para a seleção da estirpe a ser utilizada na produção do MR foi realizado um estudo anterior com 14 cepas de *Salmonella enterica* Typhimurium, isoladas de amostras de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos no território brasileiro, cedidos pelo Laboratório de Referência de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, juntamente com as seguintes cepas de referência: *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 13311.

Todos os isolados e as cepas de referência foram submetidos a testes para identificação fenotípica, genotípica, como também a caracterização molecular e proteômica.

8.1 Verificação da Identidade Fenotípica e Genotípica das Estirpes Avaliadas

A identidade fenotípica dos isolados foi confirmada, através da análise no sistema semi-automatizado ViteK 2.0 (bioMérieux, France), que forneceu dados sobre o perfil fenotípico dos micro-organismos, frente aos substratos bioquímicos presentes no cartão GN.

Foi também realizado teste de identificação genotípica, na qual foi empregada a Reação da Cadeia da Polimerase, baseada na metodologia de Kim et al (2006), que com alvo o gene *STM4497*, comum entre estirpes de *Salmonella* Typhimurium.

8.2. Caracterização Molecular

A tipificação molecular foi realizada através da técnica do *Multilocus Sequence Typing* (MLST). O estudo da caracterização dos alelos de sete genes constitutivos conservados (*thrA*, *purE*, *sucA*, *hisD*, *aroC*, *hemD*, *dnaN*) foi empregado, de acordo com as informações descritas no banco de dados do MLST da Universidade de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>). De cada um dos 14 isolados e das duas cepas de referência foram obtidas numerações referentes a identificação do alelo de cada um dos genes estudados.

8.3. Método de Caracterização Utilizado na Seleção da Cepa a ser Empregada na Produção do Candidato a MR

Para a seleção do isolado foi empregada a metodologia do MALDI-TOF. Todas as 14 estirpes de *S. Typhimurium* e as duas cepas de referência utilizadas foram submetidas a análise do perfil proteômico por MALDI-TOF (Sistema VITEK MS, BioMérieux, France) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Para cada estirpe avaliada foram atribuídos *scores* de qualidade, seguidos da identificação da espécie. A partir de um dendrograma gerado pelo *software Saramis Premium* (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010), foi possível selecionar um isolado, cujo perfil proteômico mais se aproximasse ao de uma das cepas de referência utilizadas. Desta forma, foi selecionado o isolado, cujo perfil proteômico foi próximo ao da cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Foi verificada a correlação da numeração dos alelos dos isolados selecionado, obtido no MLST, com a numeração de alelos das cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 14028.

A cepa **SALM 16** selecionada para o preparo do lote foi depositada na “Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P5432.

9. PRODUÇÃO DO LOTE DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

9.1. Matriz

Como matriz, será utilizado o leite desnatado (Difco, USA), esterilizado a 115 °C por 15 minutos, suplementado com 100 mM de trealose (SIGMA, USA).

9.2.Ambientes Adequados para os Aspectos de Produção

A produção do MR será realizada no Setor de Alimentos do Departamento de microbiologia do INCQS. A primeira etapa, que compreende no preparo da cultura, concentração do inoculo, contaminação da matriz e distribuição do material nos frascos será realizada no laboratório de microbiologia, localizado na sala 109 do Bloco 02 do INCQS. Os procedimentos de concentração da cultura serão realizados em cabine de segurança biológica.

Logo após o material ser distribuído em frascos, serão encaminhados à Sala de Preparo de Itens de Ensaio e de Materiais de Referência do Setor de Alimentos/DM, localizado no sub-solo do bloco 6 do INCQS, onde serão estocados em ultrafreezer (Thermo, USA) à temperatura inferior a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e posteriormente liofilizados.

9.3.Processamento do Material

Todas as informações sobre os materiais e equipamentos utilizados durante a produção, assim como os resultados obtidos serão registrados formulários de controle com dados da produção.

9.4.Preparo da Suspensão Bacteriana

A partir do criotubo contendo a cepa *S. Typhimurium* P5432, depositada na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária - INCQS/FIOCRUZ, será realizado o teste de pureza do material, pela técnica de esgotamento em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Difco, USA) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (Acumedia, USA). Paralelamente, 100 μL do material será semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD, USA). A placa de TSA e o caldo BHI serão incubados a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após a incubação, será verificada a pureza da cultura no TSA. O resultado será registrado em um formulário com dados da produção.

Da cultura do caldo BHI, será transferida uma alíquota de 500 μL para tubo contendo 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (Difco, USA) acrescido de 2,4% de cloreto de sódio (Merck, Alemanha), que será incubado a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 28 h. Após o período de incubação, 8 alíquotas de 1mL da cultura obtida, serão transferidas para oito microtubos estéreis com capacidade de 2 mL. Os microtubos serão centrifugados a 10.000 rpm/10 min (Eppendorf 5418, Germany) e os sobrenadantes descartados. Em quatro microtubos será acrescentado um volume de 1 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1 % (preparo por formulação). Os microtubos serão homogeneizados em aparelho agitador de tubos (Ika, USA), até que todo o precipitado solte do fundo do tubo. As suspensões obtidas serão transferidas, cada uma para um dos quatro microtubos restantes, que posteriormente serão homogeneizados e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. Os precipitados de dois microtubos serão ressuspensos com 2 mL de solução de trealose a 100 mM. A suspensão obtida será homogeneizada e transferida para tubos 10 x 80mm para o controle da concentração de células, a partir da leitura da transmitância em aparelho colorímetro (Libra S2, Biochrom, England) em comprimento de onda de 520 nm, calibrado com a mesma solução utilizada na suspensão do micro-organismo. A concentração da suspensão de células será ajustada para uma transmitância de 2% (equivalente a $2 \times 10^9\text{ UFC.mL}^{-1}$). Após a leitura, a suspensão será mantida a $2 \text{ a } 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 30 minutos.

9.5.Contaminação da Matriz e Controle da Concentração de Células

Um volume de 3 mL da suspensão será transferido para um béquer contendo 597 mL de leite desnatado estéril, suplementado com 100 mM de trealose. Será adicionado um magneto estéril ao béquer e posicionado na superfície de um aparelho agitador magnético. A suspensão será submetida a agitação por aproximadamente 20 minutos. Nesta etapa, espera-se obter uma concentração aproximada de $1,0 \times 10^7\text{ UFC.mL}^{-1}$.

Para a análise de controle da concentração de células na matriz, serão preparadas cinco diluições decimais, de forma a se obter contagens entre 25-250 unidades formadoras de colônias (UFC). Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL da diluição 10^{-5} , serão adicionadas separadamente e em duplicata, em placas de Petri vazias e estéreis, onde serão acrescentados, aproximadamente 20 mL de TSA com 0,6% de extrato de levedura, previamente fundido e mantido em banho termostático à temperatura aproximada de $48 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. As placas serão incubadas em posição invertida a $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h e posteriormente submetidas a contagem, a fim de se verificar a concentração de células esperada foi atingida. Os resultados das contagens serão registrados.

9.6.Distribuição do Material

Volumes de 1 mL da suspensão da matriz contendo o micro-organismo serão distribuídos em 416 frascos de vidro estéreis (Schott, Brasil), através da utilização de uma bomba peristáltica

(Watson, England) calibrada. Posteriormente, em cada frasco, será acoplada uma rolha de borracha (West, Brasil) estéril, própria para liofilização. As estantes contendo os frascos serão transportadas dentro de recipientes plásticos, limpos e fechados para a sala de preparo de materiais de referência e estocados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C, por um período mínimo de 15 h.

9.7.Liofilização do Material

Os frascos do lote serão divididos em dois sub-lotes, a fim de atender a capacidade do equipamento liofilizador (K105 Liotop, Brasil). Cada sub-lote será submetido a um ciclo de liofilização por um período de 24 h. Após o término do ciclo, os frascos serão fechados sob vácuo e serão registrados os parâmetros da liofilização. A presença de vácuo nos frascos será verificada, com a utilização de um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil). Os frascos que não apresentarem vácuo no interior, quando submetidos a centelha elétrica serão descartados.

Os frascos de cada sub-lote serão numerados e identificados, como pertencentes ao lote, com as seguintes especificações: “Candidato a Bactéria de Referência”, com a sigla CBR, com a identificação da bactéria, do ano de produção e da numeração do frasco no lote.

Os frascos serão lacrados com tampa de metal utilizando alicate recravador, armazenados em caixas identificadas e estocados em *ultrafreezer* a aproximadamente -70 °C. Será registrada a quantidade de frascos cujo resultado da verificação de vácuo foi satisfatória e dos que foram descartados por falta de vácuo ou por apresentarem outras características visíveis tais como: rachadura nos frascos ou caramelização da matriz.

9.8.Faixa de Concentração Esperada

É esperado que o lote candidato a MR apresente concentração aproximada de *Salmonella* de 1×10^7 UFC.mL⁻¹. No entanto, caso a concentração alcançada, após a finalização do preparo não seja a definida, não constituirá um fator limitante para a utilização do lote. A concentração final do candidato a MR deverá ser avaliada pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR.

10.CONTROLES A SEREM APLICADOS AO LOTE CANDIDATO A MR

10.1.Estudo da Pureza do Material

Dez frascos, que correspondem a 2% do lote produzido, serão selecionados de forma aleatória e submetidos ao teste de pureza. Cada líofilo será reconstituído e semeado pela técnica de esgotamento na superfície de uma placa de TSA com extrato de levedura. Após a incubação a 35°C/48 h, deverá ser verificado apenas um tipo de morfologia colonial em todas as placas semeadas.

10.2.Teste da Homogeneidade do Lote

Para o teste da homogeneidade será realizada uma avaliação quantitativa. Os frascos serão analisados sob condições de repetitividade, conforme metodologia de plaqueamento direto, em em 10 mL de TSA com 0,6% de extrato de levedura, com sobrecamada de 5 mL de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), descrita por Kornachi & Johnson no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*, 4^o Edition, 2001.

Serão selecionados de forma aleatória sistemática 20 (vinte) frascos de cada sub-lotes. Sub-lote. O cálculo do número mínimo de frascos a serem analisados no teste, será obtido através da aplicação da fórmula: $3x^3\sqrt{n}$, onde n é o número de frascos produzidos.

As análises referentes ao teste serão realizadas de acordo com as datas estabelecidas no cronograma deste planejamento.

Os valores das contagens serão expressos em log₁₀ e registrados. A avaliação estatística do teste será baseada na análise da variância (ANOVA) seguindo as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012.

10.3.Estudos de Estabilidade do Lote

Será realizado o estudo de estabilidade de curta duração e de longa duração. A metodologia de contagem será a mesma aplicada no teste da homogeneidade.

O estudo de longa duração será realizado nas temperaturas de armazenamento (-20 °C) e de referência (menor que -70 °C). As análises serão realizadas com 2 (dois) frascos de cada uma das temperaturas a cada 15 dias e terá a duração aproximada de 1 (um) ano. Os frascos selecionados aleatoriamente para o estudo da temperatura de armazenamento (-20 °C) serão

transferidos da temperatura de referência (menor que -70°C) para a temperatura de armazenamento (-20 °C) após o resultado do teste da homogeneidade.

O estudo de curta duração será desenhado no modelo isócrono (Lamberty, Schimmel e Pauwels 1997), nas temperaturas de 4 °C e 38 °C. O tempo zero será avaliado a partir de dois itens de ensaio armazenados na temperatura de referência. Serão utilizados 8 frascos para o estudo em cada uma das temperaturas.

Para a avaliação estatística da estabilidade será considerada a média dos valores de cada dia de estudo, convertidos em \log_{10} . As avaliações estatísticas da estabilidade serão realizadas utilizando como base a ABNT ISO GUIA 35:2012, que preconiza a análise de resíduos da regressão linear.

11. CARACTERIZAÇÃO DO CBR

11.1. Verificação da Autenticidade Fenotípica do CRB Após a Produção

Para a verificação da autenticidade do material e caracterização fenotípica, serão utilizados oito frascos, selecionados aleatoriamente, que serão submetidos aos testes fenotípicos no sistema semi-automatizado ViteK 2.0. Serão utilizadas as cepas de referência: *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028.

11.2. Verificação da Autenticidade Genotípica do CRB Após a Produção

O ensaio para a verificação da autenticidade genotípica será realizado com o isolado utilizado para o preparo do lote, com oito frascos do lote produzido selecionados aleatoriamente e com as cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028. Todos serão submetidos a metodologia de reação em cadeia da polimerase descrita por Kim et al (2006).

11.3. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método MLST

Oito frascos retirados da temperatura de referência serão submetidos ao sequenciamento e a avaliação dos alelos dos sete genes constitutivos conservados pela técnica do MLST da Universidade Warwick, como descrito no item 8.2. Os resultados deverão ser os mesmos aos obtidos com a estirpe selecionada, antes da produção do lote estudado, a fim de assegurar a inexistência de alterações genotípicas importantes para o MR.

11.4. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método da ERIC-PCR

No método da ERIC-PCR serão utilizadas as cepas de referência *S. Typhimurium* ATCC 13311 e *S. Typhimurium* ATCC 14028, a estirpe utilizada para o preparo do CBR e oito unidades analisadas do lote. Será verificada a estabilidade e uniformidade genômica entre a estirpe utilizada no preparo do CBR e as unidades analisadas do lote, que devem apresentar o mesmo perfil de bandas.

11.5. Caracterização Molecular Adicional do CBR pelo Sequenciamento do gene STM 4497

Uma unidade do lote será cultivada para posterior extração de DNA, que será submetido a reação de PCR com o gene STM4497. O produto da amplificação será purificado e sequenciado. A sequência de nucleotídeos obtida será comparada com as sequências do *GeneBank database*, obtendo-se a significância estatística da correlação.

Resultados não esperados na caracterização fenotípica, genotípica e molecular, deverão ser avaliados pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR (CT).

12. ATRIBUIÇÃO DE VALORES E PROPRIEDADES

Esta propriedade será determinada a partir da confirmação dos resultados dos testes de autenticidade fenotípica e genotípica e da caracterização molecular da cepa utilizada no desenvolvimento do MR.

13. ROTULAGEM DO MATERIAL

Após a aprovação do lote como MRC, os frascos serão submetidos à troca das etiquetas. Na nova etiqueta, terá o logo do INCQS/Fiocruz, a identificação do MR como Bactéria de Referência Certificada, a identificação da espécie bacteriana e a numeração corrente das Bactérias de Referência Certificadas (BRC).

CRONOGRAMA

Todas as etapas da produção e controle do lote candidato a MR, estão listadas na Tabela 1.

Descrição das Atividades	Datas
Confirmação da Identidade fenotípica e genotípica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização proteômica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização molecular dos isolados e das cepas	Já realizado
Preparação do lote candidato a MR	26/07 a 04/08/2016
Estudo de Homogeneidade	Até 15/08/16
Início do Estudo de Estabilidade de Longa Duração	Até 15/08/16
Envio dos Resultados de Homogeneidade	Até 20/08/16
Estudo de Estabilidade de Curta Duração	Até 24/10/16
Verificação das Características Fenotípicas e Genotípicas	Até 15/09/16
Caracterização Molecular	Até 20/09/16
Reunião com a Equipe Participante do Projeto	Até 05/10/16
Estabelecimento de Planilhas de Incerteza e Estimativas de Incerteza de Valores Certificados	Até 05/10/16
1º Certificação do Material	Até 30/12/16

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA. **ABNT NBR ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

KIM, H.J., PARK, S.H.; KIM, H.Y. Comparison of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 and nonLT2 Salmonella genomic sequences, and genotyping of salmonellae by using PCR. **Appl Environ Microbiol** v.72, p.6142–6151, 2006.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, D.C: APHA, 2001. chap. 8, p. 69-80.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J Anal Chem**, v.360, p.359–361, 1998.

PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO:

Lote Candidato a Material de Referência Microbiológico *Escherichia coli*

1.INTRODUÇÃO:

Este documento apresenta as condições de preparo e controle do lote candidato à bactéria de referência (CBR) microbiológico qualitativo e quantitativo de *Escherichia coli*. Os controles da qualidade que serão aplicados ao CBR visam atender aos requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012 e as orientações da NIT-DICLA 061:2012.

Após a produção e controle será realizada a certificação do material.

2.FINANCIAMENTO

A produção deste material de referência será realizada com recursos do projeto CNPQ/ANVISA – 44012720149 e com a infraestrutura do INCQS.

3.OBJETIVOS

Produzir Material de Referência (MR) para uso como controle interno de análises destinados a laboratórios públicos e privados, que atuam em atividades na área da microbiologia.

4.SUBCONTRATAÇÃO

Foi utilizado o equipamento MALDI-TOF de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, na etapa anterior a produção, quando foi realizada a seleção da cepa empregada no preparo de lote.

Na caracterização molecular do lote serão utilizados os serviços de sequenciamento genético, da plataforma de sequenciamento localizada no Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Os serviços citados são únicos na FIOCRUZ, sendo o uso disponibilizado para a comunidade científica da instituição.

5.COMITÊ TÉCNICO (CT) RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO DO LOTE CANDIDATO A MR

Carla de O. Rosas, Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso, Marcelo Luiz L. Brandão, Marcus Henrique C. de la Cruz, Sílvia dos Reis Lopes, Valéria de Mello Medeiros.

6.DISPONIBILIZAÇÃO DO MATERIAL

O material será disponibilizado como bactéria de referência *E. coli* certificada.

Pretende-se que o lote esteja disponível a partir de março de 2018. Ao ser fornecido, será transportado em condições que atendam aos critérios de transporte de material biológico da *International Air Transport Association* - IATA. Serão considerados os resultados do estudo de estabilidade de curta duração descritos neste documento, para a escolha da temperatura de transporte do MR com segurança.

7.DOCUMENTAÇÃO DO MR

Juntamente com o MR, será fornecida documentação com orientações sobre os procedimentos adequados para o manuseio do material, biossegurança, aplicação apropriada e armazenamento.

Constarão na documentação informações sobre os ensaios de controles e os testes de caracterização aplicados ao material e a validade das informações declaradas.

8. SELEÇÃO DO ISOLADO A SER UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO MR

(Já realizada na 1ª etapa do estudo, antes da elaboração do planejamento de produção).

Para a seleção da estirpe a ser utilizada na produção do MR foi realizado um estudo anterior com 13 isolados de *E. coli*, obtidos de amostras de alimentos, no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), juntamente com as seguintes cepas de referência do provedor *American Type Culture Collection* (ATCC): *E. coli* ATCC 25922; *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 10536.

Todos os isolados e as cepas de referência foram submetidos a testes para identificação fenotípica, identificação genotípica, caracterização molecular e proteômica.

8.1. Verificação da Identidade Fenotípica e Genotípica das Estirpes Avaliadas

A identidade fenotípica dos isolados foi confirmada, através da análise no sistema semi-automatizado ViteK 2.0 (bioMérieux, France), que forneceu dados sobre o perfil fenotípico dos micro-organismos, frente aos substratos bioquímicos presentes no cartão GN.

Foi também realizado um teste de identificação genotípica, na qual foi empregada a Reação da Cadeia da Polimerase, baseada na metodologia de Chen & Griffiths (1998), que tem como alvo o gene *uspA*, comum ente as estirpes de *E. coli*.

8.2. Caracterização Molecular

A tipificação genotípica foi realizada através da técnica do *Multilocus Sequence Typing* (MLST). O estudo da caracterização dos alelos de sete genes constitutivos conservados (*adK*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdH*, *purA* e *recA*) foi empregado, de acordo com as orientações descritas no banco de dados do MLST de *E. coli* da Universidade de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). De cada um dos 13 isolados e das três cepas de referência foram obtidas numerações referentes a identificação do alelo de cada um dos sete genes estudados.

8.3. Método de Caracterização Utilizado na Seleção da Cepa a ser Empregada na Produção do Candidato a MR

Para a seleção do isolado foi empregada a metodologia do MALDI-TOF. Todas as 13 estirpes de *E. coli* e as três cepas de referência utilizadas foram submetidas a análise do perfil proteômico por MALDI-TOF (Sistema VITEK MS, BioMerieux, France) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Para cada estirpe avaliada foram atribuídos *scores* de qualidade, seguidos da identificação da espécie. A partir de um dendrograma gerado pelo *software Saramis Premium* (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010), foi possível selecionar um isolado, cujo perfil proteômico mais se aproximasse ao de uma das cepas de referência utilizadas. Desta forma, foi selecionado o isolado, cujo perfil proteômico foi próximo ao da cepa *E. coli* ATCC 25922.

Foi verificada a correlação da numeração dos alelos do isolado selecionado, obtido pelo MLST, com a numeração de alelos das cepas de referência cepa *E. coli* ATCC 25922.

A cepa **EC 84** selecionada foi depositada na “Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P5444.

9.1. PRODUÇÃO DO LOTE DE MATERIAL DE REFERÊNCIA

9.1. Matriz

Como matriz, será utilizado o leite desnatado (Difco, USA), esterilizado a 115 °C por 15 minutos, suplementado com 100 mM de sacarose (DIFCO, USA).

9.2 Ambientes Adequados para os Aspectos de Produção

A produção do MR será realizada no Setor de Alimentos do Departamento de microbiologia do INCQS. A primeira etapa, que compreende no preparo da cultura, concentração do inóculo, contaminação da matriz e distribuição do material nos frascos será realizada no laboratório de microbiologia, localizado na sala 109 do Bloco 02 do INCQS. Os procedimentos de concentração da cultura serão realizados em cabine de segurança biológica.

Logo após o material ser distribuído em frascos, serão encaminhados à Sala de Preparo de Itens de Ensaio e de Materiais de Referência do Setor de Alimentos/DM, localizado no sub-solo do

bloco 6 do INCQS, onde serão estocados em ultrafreezer (Thermo, USA) à temperatura inferior a -70 °C por 24 horas e posteriormente liofilizados.

9.3. Processamento do Material

Todas as informações sobre os materiais e equipamentos utilizados durante a produção, assim como os resultados obtidos serão registrados em formulários de controle com dados da produção.

9.4. Preparo da Suspensão Bacteriana

A partir do criotubo contendo a cepa *E. coli* P5444, depositada na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária - INCQS/FIOCRUZ, será realizado o teste de pureza do material, pela técnica de esgotamento em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Difco, USA) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (Acumedia, USA). Paralelamente, 100 µL do material será semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (BD, USA). A placa de TSA e o caldo BHI serão incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação, será verificada a pureza da cultura no TSA. O resultado será registrado em um formulário com dados da produção.

Da cultura do caldo BHI, será transferida uma alíquota de 500 µL para tubo contendo 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (Difco, USA) acrescido de 2,4% de cloreto de sódio (Merck, Alemanha), que será incubado a 35 ± 2 °C por 28 h. Após o período de incubação, 8 alíquotas de 1 mL da cultura obtida, serão transferidas para oito microtubos estéreis com capacidade de 2 mL. Os microtubos serão centrifugados a 10.000 rpm/10 min (Eppendorf 5418, Germany) e os sobrenadantes descartados. Em quatro microtubos será acrescentado um volume de 1 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1 % (preparo por formulação). Os microtubos serão homogeneizados em aparelho agitador de tubos (Ika, USA), até que todo o precipitado solte do fundo do tubo. As suspensões obtidas serão transferidas, cada uma para um dos quatro microtubos restantes, que posteriormente serão homogeneizados em aparelho agitador de tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. Os precipitados de dois microtubos serão ressuspensos com 2 mL de solução de trealose a 100 mM. A suspensão obtida será homogeneizada e transferida para tubos 10 x 80 mm para o controle da concentração de células, a partir da leitura da transmitância em aparelho colorímetro (Libra S2, Biochrom, England) em comprimento de onda de 520 nm, calibrado com a mesma solução utilizada na suspensão do micro-organismo. A concentração da suspensão de células será ajustada para uma transmitância de 2% (equivalente a 2×10^9 UFC.mL⁻¹). Após a leitura, a suspensão será mantida a 2 ± 8 °C durante aproximadamente 30 minutos.

9.5. Contaminação da Matriz e Controle da Concentração de Células

O volume de 3 mL da suspensão será transferido para um béquer contendo 597 mL de leite desnatado estéril, suplementado com 100 mM de sacarose. Será adicionado um magneto estéril ao béquer e posicionado na superfície de um aparelho agitador magnético. A suspensão será submetida a agitação por aproximadamente 20 minutos. Nesta etapa, espera-se obter uma concentração aproximada de 1×10^7 UFC.mL⁻¹.

Para a análise de controle da concentração de células na matriz, serão preparadas cinco diluições decimais, de forma a se obter contagens entre 25-250 unidades formadoras de colônias (UFC). Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL da diluição 10^{-5} , serão adicionadas separadamente e em duplicata, em placas de Petri vazias e estéreis, onde serão acrescentados, aproximadamente 15 mL de TSA com 0,6% de extrato de levedura, previamente fundido e mantido em banho termostático à temperatura aproximada de 48 ± 2 °C. As placas serão incubadas em posição invertida a 35 ± 2 °C por 48 h e posteriormente submetidas a contagem, a fim de se verificar a concentração de células esperada foi atingida. Os resultados das contagens serão registrados.

9.6. Distribuição do Material

Volumes de 1 mL da suspensão da matriz contendo o micro-organismo serão distribuídos em 416 frascos de vidro estéreis (Schott, Brasil), através da utilização de uma bomba peristáltica (Watson, England) calibrada. Posteriormente, em cada frasco, será acoplada uma rolha de borracha (West, Brasil) estéril, própria para liofilização. As estantes contendo os frascos serão transportadas dentro de recipientes plásticos, limpos e fechados para a sala de preparo de materiais de referência e estocados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C, por um período mínimo de 15 h.

9.7. Liofilização do Material

Os frascos do lote serão divididos em dois sub-lotes, a fim de atender a capacidade do equipamento liofilizador (K105 Liotop, Brasil). Cada sub-lote será submetido a um ciclo de liofilização por um período de 24 h. Após o término do ciclo, os frascos serão fechados sob vácuo e serão registrados os parâmetros da liofilização. A presença de vácuo nos frascos será verificada, com a utilização de um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil). Os

frascos que não apresentarem vácuo no interior, quando submetidos à centelha elétrica serão descartados.

Os frascos de cada sub-lote serão numerados e identificados, como pertencentes ao lote, com as seguintes especificações: “Candidato a Bactéria de Referência”, com a sigla CBR, com a identificação da bactéria, do ano de produção e da numeração do frasco no lote.

Os frascos serão lacrados com tampa de metal utilizando alicate recravador, armazenados em caixas identificadas e estocados em *ultrafreezer* a aproximadamente -70 °C. Será registrada a quantidade de frascos cujo resultado da verificação de vácuo foi satisfatório e dos que foram descartados por falta de vácuo ou por apresentarem outras características visíveis tais como: rachadura nos frascos ou caramelização da matriz.

9.8.Faixa de Concentração Esperada

É esperado que o lote candidato a MR apresente concentração aproximada de *E. coli* de 1×10^7 UFC.mL⁻¹. No entanto, caso a concentração alcançada após a finalização do preparo não seja a definida, não constituirá um fator limitante para a utilização do lote. A concentração final do candidato a MR deverá ser avaliada pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR.

10.CONTROLES A SEREM APLICADOS AO LOTE CANDIDATO A MR

10.1.Estudo da Pureza do Material

Dez frascos, que correspondem a 2% do lote produzido, serão selecionados de forma aleatória e submetidos ao teste de pureza. Cada líofilo será reconstituído e semeado pela técnica de esgotamento na superfície de uma placa de TSA com 0,6% de extrato de levedura. Após a incubação a 35°C/48 h, deverá ser verificado apenas um tipo de morfologia colonial em todas as placas semeadas.

10.2.Teste da Homogeneidade do Lote

Para o teste da homogeneidade será realizada uma avaliação quantitativa. Os frascos serão analisados sob condições de repetitividade, através de contagem por plaqueamento direto em 10 mL de TSA com 0,6% de extrato de levedura, com sobrecamada de 5 mL de ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA), conforme metodologia descrita por Feng et al (2002). Serão selecionados de forma aleatória sistemática 20 (vinte) frascos de cada sub-lotes. Sub-lote. O cálculo do número mínimo de frascos a serem analisados no teste, será obtida através da aplicação da fórmula: $3 \times \sqrt[3]{n}$, onde n é o número de frascos produzidos.

As análises referentes ao teste serão realizadas de acordo com as datas estabelecidas no cronograma deste planejamento.

Os valores das contagens serão expressos em log₁₀ e registrados. A avaliação estatística do teste será baseada na análise da variância (ANOVA) seguindo as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012.

10.3. Estudos de Estabilidade do Lote

Será realizado o estudo de estabilidade de curta duração e de longa duração. A metodologia de contagem será a mesma aplicada no teste da homogeneidade.

O estudo de longa duração será realizado nas temperaturas de armazenamento (-20 °C) e de referência (menor que -70 °C). As análises serão realizadas com 2 (dois) frascos de cada uma das temperaturas a cada 15 dias e terá a duração aproximada de 1 (um) ano. Os frascos selecionados aleatoriamente para o estudo da temperatura de armazenamento (-20 °C) serão transferidos da temperatura de referência (menor que -70°C) para a temperatura de armazenamento (-20 °C) após o resultado do teste da homogeneidade.

O estudo de curta duração será desenhado no modelo isócrono (Lamberty, Schimmel e Pauwels 1997), nas temperaturas de 4 °C e 38 °C. O tempo zero será avaliado a partir de dois itens de ensaio armazenados na temperatura de referência. Serão utilizados 8 frascos para o estudo em cada uma das temperaturas.

Para a avaliação estatística da estabilidade será considerada a média dos valores de cada dia de estudo, convertidos em log₁₀. As avaliações estatísticas da estabilidade serão realizadas utilizando como base a ABNT ISO GUIA 35:2012, que preconiza a análise de resíduos da regressão linear.

11 CARACTERIZAÇÃO DO CBR

11.1. Verificação da Autenticidade Fenotípica do CBR Após a Produção

Para a verificação da autenticidade do material e caracterização fenotípica, serão utilizados oito frascos, selecionados aleatoriamente, que serão submetidos aos testes fenotípicos no sistema semi-automatizado Vitek 2.0. Serão utilizadas as cepas de referência: *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 25922.

11.2. Verificação da Autenticidade Genotípica do CBR Após a Produção

O ensaio para a verificação da autenticidade genotípica será realizado com o isolado utilizado para o preparo do lote, com oito frascos do lote produzido selecionados aleatoriamente e com as cepas de referência *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 25922. Todos serão submetidos a metodologia de reação em cadeia da polimerase descrita por Chen & Griffiths (1998) e deverão apresentar o mesmo perfil de banda na amplificação do gene *uspA* com fragmentos de 884 pb.

11.3. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método MLST

Oito frascos retirados da temperatura de referência serão submetidos ao sequenciamento e a avaliação dos alelos dos sete genes constitutivos conservados pela técnica do MLST da Universidade Warwick, como descrito no item 8.2. Os resultados deverão ser os mesmos aos obtidos com a estirpe selecionada, antes da produção do lote estudado, a fim de assegurar a inexistência de alterações genotípicas importantes para o MR.

11.4. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método da ERIC-PCR

No método da ERIC-PCR serão utilizadas as cepas de referência *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 23724 e *E. coli* ATCC 25922, a estirpe utilizada para o preparo do CBR e oito unidades analisadas do lote. Será verificada a estabilidade e uniformidade genômica entre a estirpe utilizada no preparo do CBR e as unidades analisadas do lote, que devem apresentar o mesmo perfil de bandas.

11.5. Caracterização Molecular Adicional do CBR pelo Sequenciamento do gene *uspA*

Uma unidade do lote será cultivada para posterior extração de DNA, que será submetido a reação de PCR com o gene *uspA*. O produto da amplificação será purificado e sequenciado. A sequência de nucleotídeos obtida será comparada com as sequências do *GeneBank database*, obtendo-se a significância estatística da correlação.

Resultados não esperados na caracterização fenotípica, genotípica e molecular, deverão ser avaliados pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR (CT).

Resultados não esperados na caracterização fenotípica, genotípica e molecular, deverão ser avaliados pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR (CT).

12. ATRIBUIÇÃO DE VALORES E PROPRIEDADES

Esta propriedade será determinada a partir da confirmação dos resultados dos testes de autenticidade fenotípica e genotípica e da caracterização molecular da cepa utilizada no desenvolvimento do MR.

13. ESTABELECIMENTO DE PLANILHAS DE INCERTEZA E ESTIMATIVA DE INCERTEZA(S) DE VALORE(S) CERTIFICADO(S)

A certificação será baseada na concentração de células em UFC.mL⁻¹. Será calculada a incerteza combinada e a expandida, através da soma das incertezas da caracterização quantitativa, homogeneidade, das estabilidades e de um estudo interlaboratorial.

14. ROTULAGEM DO MATERIAL

Os frascos do lote aprovado como MRC serão submetidos a troca das etiquetas. Na nova etiqueta, terá o logo do INCQS/Fiocruz, a identificação do MR como Bactéria de Referência Certificada, a identificação da espécie bacteriana e a numeração corrente da Bactéria de Referência Certificadas (BRC).

CRONOGRAMA

As etapas da produção e controle do lote candidato a MR são listadas na Tabela 1.

Descrição das Atividades	Datas
Confirmação da Identidade fenotípica e genotípica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização proteômica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização molecular dos isolados e das cepas	Já realizado
Preparação do lote candidato a MR	26/07 a 04/08/2016
Estudo de Homogeneidade	Até 15/08/16
Início do Estudo de Estabilidade de Longa Duração	Até 15/08/16
Envio dos Resultados de Homogeneidade	Até 20/08/16
Estudo de Estabilidade de Curta Duração	Até 24/10/16
Verificação das Características Fenotípicas e Genotípicas	Até 15/09/16
Caracterização Molecular	Até 20/09/16
Reunião com a Equipe Participante do Projeto	Até 05/10/16
Estabelecimento de Planilhas de Incerteza e Estimativas de Incerteza de Valores Certificados	Até 05/10/16
1º Certificação do Material	Até 30/12/16

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

CHEN, J, GRIFFITHS M.W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Lett. Appl. Microbiol**, v.27, p.369 –371, 1998.

FENG, P.; STEPHEN, D.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A.; BURKHARDT, W. Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. In: **Bacteriological analytical manual online**. FDA, 2002. Chapter 4. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>>. Acesso em: 02 abr. 20.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J Anal Chem**, v.360, p.359–361, 1998.

Elaboração do documento: 12 de junho de 2016.

PLANEJAMENTO DA PRODUÇÃO:

Lote Candidato a Material de Referência Microbiológico *Listeria monocytogenes*

1. INTRODUÇÃO:

Este documento apresenta as condições de preparo e controle do lote candidato a material de referência microbiológico qualitativo de *Listeria monocytogenes*. Os controles da qualidade que serão aplicados ao CBR visam atender aos requisitos da ABNT ISO GUIA 34:2012 e as orientações da NIT-DICLA 061:2012.

Após a produção e controle será realizada a certificação do material.

2. FINANCIAMENTO

A produção deste material de referência será realizada com recursos do projeto CNPQ/ANVISA – 44012720149 e com a infraestrutura do INCQS.

3. OBJETIVOS

Produzir Material de Referência (MR) para uso como controle interno de ensaios destinados a laboratórios públicos e privados, que atuam em atividades na área da microbiologia.

4. SUBCONTRATAÇÃO

Foi utilizado o equipamento MALDI-TOF de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, na etapa anterior a produção, quando foi realizada a seleção da cepa empregada no preparo de lote.

Na caracterização molecular do lote serão utilizados os serviços de sequenciamento genético, da plataforma de sequenciamento localizada no Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Os serviços citados são únicos na FIOCRUZ, sendo o uso disponibilizado para a comunidade científica da instituição.

4. COMITÊ TÉCNICO (CT) RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO DO LOTE CANDIDATO A MR

Carla de O. Rosas, Ivano Raffaele V. de Filippis Capasso, Marcelo Luiz L. Brandão, Marcus Henrique C. de la Cruz, Sílvia dos Reis Lopes, Valéria de Mello Medeiros.

5. DISPONIBILIZAÇÃO DO MATERIAL

O material será disponibilizado como bactéria de referência *L. monocytogenes* certificada.

Pretende-se que o lote esteja disponível a partir de abril de 2018. Ao ser fornecido, será transportado em condições que atendam aos critérios de transporte de material biológico da *International Air Transport Association* - IATA. Serão considerados os resultados do estudo de estabilidade de curta duração descritos neste documento, para a escolha da temperatura de transporte do MR com segurança.

6. DOCUMENTAÇÃO DO MR

Juntamente com o MR, será fornecida documentação com orientações sobre os procedimentos adequados para o manuseio do material, biossegurança, aplicação apropriada e armazenamento do MR.

Constarão na documentação informações sobre os ensaios de controles e os testes de caracterização aplicados ao material e a validade das informações declaradas.

8. SELEÇÃO DO ISOLADO A SER UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO MR

(Já realizada na 1º etapa do estudo, antes da elaboração do planejamento de produção).

Para a seleção da estirpe a ser utilizada na produção do MR foi realizado um estudo anterior com 13 isolados de *L. monocytogenes*, obtidos de amostras de alimentos no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ. Foram também utilizadas as seguintes cepas de referência: *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751.

Todos os isolados e as cepas de referência foram submetidos a testes para identificação fenotípica, genotípica, como também a caracterização molecular e proteômica.

8.1. Verificação da Identidade Fenotípica e Genotípica das Estirpes Avaliadas

A identidade fenotípica dos isolados foi confirmada através da análise no kit *api listeria* (bio-merieux, france) que forneceu dados sobre o perfil bioquímico das estirpes, frente aos substratos bioquímicos presentes no kit, específicos para o gênero *listeria*.

Foi também realizado teste de identificação genotípica, na qual foi empregada a Reação da Cadeia da Polimerase, baseada na metodologia de Jung et al (2003), com alvo no gene *InlAB*, comum entre estirpes da espécie *L. monocytogenes*.

8.2. Caracterização Molecular

A tipificação molecular foi realizada através da técnica do *Multilocus Sequence Typing* (MLST). O estudo da caracterização dos alelos de sete genes constitutivos conservados (*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA*) foi empregado, de acordo com as informações descritas no banco de dados do MLST do Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Lmono.html>). De cada um dos 13 isolados e das três cepas de referência foram obtidas numerações referentes a identificação do alelo de cada um dos genes estudados.

8.3. Método de Caracterização Utilizado na Seleção da Cepa a ser Empregada na Produção do Candidato a MR

Para a seleção do isolado foi empregada a metodologia do MALDI-TOF. Todas as 13 estirpes de *L. monocytogenes* e as três cepas de referência utilizadas foram submetidas a análise do perfil proteômico por MALDI-TOF (Sistema VITEK MS, BioMerieux, France) de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. Para cada estirpe avaliada foram atribuídos *scores* de qualidade, seguidos da identificação da espécie. A partir de um dendrograma gerado pelo *software Saramis Premium* (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010), foi possível selecionar um isolado, cujo perfil proteômico mais se aproximasse ao de uma das cepas de referência utilizadas. Desta forma, foi selecionado o isolado, cujo perfil proteômico foi próximo ao da cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644. Foi verificada a correlação da numeração dos alelos do isolado selecionado, obtido no MLST, com a numeração de alelos da cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644.

A cepa **LIST 12** selecionada para o preparo do lote foi depositada na “Coleção de Microorganismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P5445.

9. MATERIAL DE REFERÊNCIA

9.1 Matriz

Como matriz, será utilizado o leite desnatado (Skim Milk, Difco), esterilizado a 115 °C por 15 minutos, suplementado com 100 mM de sacarose (DIFCO, USA).

9.2. Ambientes Adequados para os Aspectos de Produção

A produção do MR será realizada no Setor de Alimentos do Departamento de microbiologia do INCQS. A primeira etapa, que compreende no preparo da cultura, concentração do inoculo, contaminação da matriz e distribuição do material nos frascos será realizada no laboratório de microbiologia, localizado na sala 109 do Bloco 02 do INCQS. Os procedimentos de concentração da cultura serão realizados em cabine de segurança biológica.

Logo após o material ser distribuído em frascos, serão encaminhados à Sala de Preparo de Itens de Ensaio e de Materiais de Referência do Setor de Alimentos/DM, localizado no sub-solo do bloco 6 do INCQS, onde serão estocados em ultrafreezer (Thermo, USA) à temperatura inferior a -70 °C por 24 horas e posteriormente liofilizados.

9.2 Processamento do Material

Todas as informações sobre os materiais e equipamentos utilizados durante a produção, assim como os resultados obtidos serão registrados em formulários de controle com dados da produção.

9.3 Preparo da Suspensão Bacteriana

A partir de um criotubo contendo a cepa de *L. monocytogenes* P5445, depositada na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária - INCQS/FIOCRUZ) será realizado o teste de pureza do material em ágar tripticaseína de soja (TSA) (DIFCO, USA), suplementado com 0,6% de extrato de levedura (Acumedia, USA). Paralelamente, 100 µL do material será semeado em dois tubos contendo 10 mL de caldo tripticaseína de soja (TSB) (Difco, USA) suplementados com 0,6% de extrato de levedura. A placa de TSA e os tubos de caldo TSB serão incubados a 35 ± 2 °C por 24 h. Após a incubação, será verificada a pureza da cultura no TSA. O resultado será registrado em um formulário com dados da produção.

Da cultura do caldo TSB, serão transferidas alíquotas de 1 mL da cultura, para 20 microtubos estéreis com capacidade de 2 mL. Os microtubos serão centrifugados a 10.000 rpm/10 min (Eppendorf 5418, Germany) e os sobrenadantes descartados. Os pellets de dez microtubos serão ressuspensos em um volume de 1 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1 % (preparo por formulação). As suspensões obtidas serão transferidas, cada uma para um dos dez microtubos restantes, que posteriormente serão homogeneizados em aparelho agitador de tubos (Ika, USA) e centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. Para a leitura da transmitância, será utilizado o precipitado de um microtubo, ressuspensado em 1 mL de solução de sacarose (Difco, USA) a 100 mM. A suspensão obtida será homogeneizada e transferida para tubos 10 x 80 mm para o controle da concentração de células, a partir da leitura da transmitância em aparelho colorímetro (Libra S2, Biochrom, England) em comprimento de onda de 520 nm, calibrado com a mesma solução de sacarose 100 mM utilizada na suspensão do micro-organismo. A concentração da suspensão de células será ajustada para uma transmitância de 6% (equivalente a 3×10^8 UFC.mL⁻¹).

9.4 Contaminação da matriz e controle da concentração de células

Um volume de 20 mL da suspensão a uma transmitância de 6%, será transferido para um béquer contendo 580 mL de leite desnatado estéril, suplementado com 100 mM de sacarose. Será adicionado um magneto estéril ao béquer, que será posicionado na superfície de um aparelho agitador magnético. A suspensão será submetida à agitação por aproximadamente 20 minutos. Nesta etapa, espera-se obter uma concentração aproximada de 1×10^7 UFC.mL⁻¹.

Para a análise de controle da concentração de células na matriz, serão preparadas cinco diluições decimais, de forma a se obter contagens entre 25-250 unidades formadoras de colônias (UFC). Alíquotas de 1 mL e 0,1 mL da diluição 10^{-5} , serão adicionadas separadamente e em duplicata, em placas de Petri vazias e estéreis, onde serão acrescentados, aproximadamente 20 mL de TSA com 0,6% de extrato de levedura, previamente fundido e mantido em banho termostático à temperatura aproximada de 48 ± 2 °C. As placas serão incubadas em posição invertida a 35 ± 2 °C por 48 h e posteriormente submetidas à contagem, a fim de se verificar a concentração de células esperada foi atingida. Os resultados das contagens serão registrados.

9.5 Distribuição do material

Volumes de 1 mL da suspensão da matriz contendo o micro-organismo serão distribuídos em 416 frascos de vidro estéreis (Schott, Brasil), através da utilização de uma bomba peristáltica (Watson, England) calibrada. Posteriormente, em cada frasco, será acoplada uma rolha de borracha (West, Brasil) estéril, própria para liofilização. As estantes contendo os frascos serão transportadas dentro de recipientes plásticos, limpos e fechados para a sala de preparo de materiais de referência e estocados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C, por um período mínimo de 15 h.

9.6 Liofilização do material

Os frascos do lote serão divididos em dois sub-lotes, a fim de atender a capacidade do equipamento liofilizador (K105 Liotop, Brasil). Cada sub-lote será submetido a um ciclo de liofilização por um período de 24 h. Após o término do ciclo, os frascos serão fechados sob vácuo e serão registrados os parâmetros da liofilização. A presença de vácuo nos frascos será verificada, com a utilização de um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil). Os frascos que não apresentarem vácuo no interior, quando submetidos a centelha elétrica serão descartados.

Os frascos de cada sub-lote serão numerados e identificados, como pertencentes ao lote, com as seguintes especificações: "Candidato a Bactéria de Referência", com a sigla CBR, com a identificação da bactéria, do ano de produção e da numeração do frasco no lote.

Os frascos serão lacrados com tampa de metal utilizando alicate recravador, armazenados em caixas identificadas e estocados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C. Será registrada a quantidade de frascos cujo resultado da verificação de vácuo for satisfatória e dos que foram descartados por falta de vácuo ou por apresentarem outras características visíveis tais como: rachadura nos frascos ou caramelização da matriz.

9.8 Faixa de concentração esperada

É esperado que o lote candidato a MR apresente concentração aproximada de *L. monocytogenes* de 1×10^7 UFC.mL⁻¹. No entanto, caso a concentração alcançada, após a finalização do preparo não seja a definida, não constituirá um fator limitante para a utilização do lote. A concentração final do candidato a MR deverá ser avaliada pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR.

10. CONTROLE A SEREM APLICADOS AO LOTE CANDIDATO A MR

10.1. Estudo da Pureza do Material

Dez frascos, que correspondem a 2% do lote produzido, serão selecionados de forma aleatória e submetidos ao teste de pureza. Cada liófilo será reconstituído e semeado pela técnica de esgotamento na superfície de uma placa de TSA com extrato de levedura. Após a incubação a 35°C/48 h, deverá ser verificado apenas um tipo de morfologia colonial em todas as placas semeadas.

10.2. Teste da Homogeneidade do Lote

Para o teste da homogeneidade será realizada uma avaliação quantitativa. Os frascos de cada sub-lote serão analisados sob condições de repetitividade, conforme metodologia de plaqueamento direto, com uma camada base de 10 mL de ágar tripticaseína de soja contendo 0,6% de extrato de levedura. Posteriormente adicionando uma sobremacada de 5 mL de ágar Cromogênico para *Listeria*, segundo metodologia descrita por Hitchins, Jinneman and Chen (2016).

Serão selecionados de forma aleatória sistemática 20 (vinte) frascos de cada sub-lotes. Sub-lote. O cálculo do número mínimo de frascos a serem analisados no teste, será obtido através da aplicação da fórmula: $3 \times \sqrt[3]{n}$, onde n é o número de frascos produzidos. As análises referentes ao teste serão realizadas de acordo com as datas estabelecidas no cronograma deste planejamento.

Os valores das contagens serão expressos em log₁₀ e registrados. A avaliação estatística do teste será baseada na análise da variância (ANOVA) seguindo as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012.

10.3 Estudos de Estabilidade do Lote

Será realizado o estudo de estabilidade de curta duração e de longa duração. A metodologia de contagem será a mesma aplicada no teste da homogeneidade.

O estudo de longa duração será realizado nas temperaturas de armazenamento (-20 °C) e de referência (menor que -70 °C). As análises serão realizadas com 2 (dois) frascos de cada uma das temperaturas a cada 15 dias e terá a duração aproximada de 1 (um) ano. Os frascos selecionados aleatoriamente para o estudo da temperatura de armazenamento (-20 °C) serão transferidos da temperatura de referência (menor que -70°C) para a temperatura de armazenamento (-20 °C) após o resultado do teste da homogeneidade.

O estudo de curta duração será desenhado no modelo isócrono (Lamberty, Schimmel e Pauwels 1997), nas temperaturas de 4 °C e 38 °C. O tempo zero será avaliado a partir de dois itens de ensaio armazenados na temperatura de referência. Serão utilizados 8 frascos para o estudo em cada uma das temperaturas.

Para a avaliação estatística da estabilidade será considerada a média dos valores de cada dia de estudo, convertidos em log₁₀. As avaliações estatísticas da estabilidade serão realizadas utilizando como base a ABNT ISO GUIA 35:2012, que preconiza a análise de resíduos da regressão linear.

11. CARACTERIZAÇÃO DO CBR

11.1. Verificação da Autenticidade Fenotípica do CRB Após a Produção

Para a verificação da autenticidade do material e caracterização fenotípica, serão utilizados oito frascos, selecionados aleatoriamente, que serão submetidos aos testes fenotípicos no Kit Api

20E. Serão utilizadas as cepas de referência: *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751

11.2. Verificação da Autenticidade Genotípica do CRB Após a Produção

O ensaio para a verificação da autenticidade genotípica será realizado com o isolado utilizado para o preparo do lote, com oito frascos do lote produzido selecionados aleatoriamente e com as cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751. Todos serão submetidos a metodologia de reação em cadeia da polimerase descrita por Jung et al (2003) e deverão apresentar o mesmo perfil de banda na amplificação do gene *inlAB* com fragmentos de 902 pb.

11.3. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método MLST

Oito frascos retirados da temperatura de referência serão submetidos ao sequenciamento e a avaliação dos alelos dos sete genes constitutivos conservados pela técnica do MLST do Instituto Pasteur, como descrito no item 8.2. Os resultados deverão ser os mesmos aos obtidos com a estirpe selecionada, antes da produção do lote estudado, a fim de assegurar a inexistência de alterações genotípicas importantes para o MR.

11.4. Caracterização Molecular dos CBR pelo Método da ERIC-PCR

No método da ERIC-PCR serão utilizadas as cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC BAA 751, a estirpe utilizada para o preparo do CBR e oito unidades analisadas do lote. Será verificada a estabilidade e uniformidade genômica entre a estirpe utilizada no preparo do CBR e as unidades analisadas do lote, que devem apresentar o mesmo perfil de bandas.

11.5. Caracterização Molecular Adicional do CBR pelo Sequenciamento do gene *inlAB*

Uma unidade do lote será cultivada para posterior extração de DNA, que será submetido a reação de PCR com o gene *inlAB*. O produto da amplificação será purificado e sequenciado. A sequência de nucleotídeos obtida será comparada com as sequências do *GeneBank database*, obtendo-se a significância estatística da correlação.

Resultados não esperados na caracterização fenotípica, genotípica e molecular, deverão ser avaliados pelo Comitê Técnico Responsável pelo Desenvolvimento do Material Candidato a MR (CT).

12. ATRIBUIÇÃO DE VALORES E PROPRIEDADES

Esta propriedade será determinada a partir da confirmação dos resultados dos testes de autenticidade fenotípica e genotípica e da caracterização molecular da cepa utilizada no desenvolvimento do MR.

13. ROTULAGEM DO MATERIAL Após a aprovação do lote como MRC, os frascos serão submetidos à troca das etiquetas. Na nova etiqueta, terá o logo do INCQS/Fiocruz, a identificação do MR como Bactéria de Referência Certificada, a identificação da espécie bacteriana e a numeração corrente das Bactérias de Referência Certificadas (BRC).

CRONOGRAMA

Todas as etapas da produção e controle do lote candidato a MR, estão listadas na Tabela 1.

Descrição das Atividades	Datas
Confirmação da Identidade fenotípica e genotípica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização proteômica dos isolados e das cepas	Já realizado
Caracterização molecular dos isolados e das cepas	Já realizado
Preparação do lote candidato a MR	26/07 a 04/08/2016
Estudo de Homogeneidade	Até 15/08/16
Início do Estudo de Estabilidade de Longa Duração	Até 15/08/16
Envio dos Resultados de Homogeneidade	Até 20/08/16
Estudo de Estabilidade de Curta Duração	Até 24/10/16
Verificação das Características Fenotípicas e Genotípicas	Até 15/09/16
Caracterização Molecular	Até 20/09/16
Reunião com a Equipe Participante do Projeto	Até 05/10/16
Estabelecimento de Planilhas de Incerteza e Estimativas de Incerteza de Valores Certificados	Até 05/10/16
1º Certificação do Material	Até 30/12/16

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

HITCHINS, A.D; JINNEMAN, K; CHEN, Y. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: BACTERIOLOGICAL analytical manual. FDA, Chapter 10, Revision January 2016. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>>. Acesso em: 16 fevereiro de 2016.

JUNG, Y.S. et al. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. **J. Food Protec.**, v.66, p.237–241, 2003.

LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.; PAUWELS, J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. **Fresenius J Anal Chem.**, v. 360, p.359-361, 1998.

APÊNDICE C – FORMULÁRIOS DO ESTUDO COLABORATIVO



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



FORMULÁRIO PARA O ACOMPANHAMENTO DO USO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA (MR) MICROBIOLÓGICOS

Salmonella Typhimurium

Nº do frasco: _____ Início da análise: ____/____/____

Metodologia Utilizada: _____

CONTROLE DA ETAPA DE ISOLAMENTO SELETIVO:

Meio Utilizado	Características coloniais esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat

Obs: _____

CONTROLE DA ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA:

Meio Utilizado	Características esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat
	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	(...)Sat ()Insat

Caso seja realizado o teste da sorologia polivalente informar no campo observação.

Obs: _____

Resultado da utilização do MR:

O MR apresentou as características de uma cepa de referência de *Salmonella* spp.?

SIM NÃO

Término da análise: ____/____/____

POP 65.1101.006 – Anexo C – Rev. 01

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



FORMULÁRIO PARA O ACOMPANHAMENTO DO USO
 DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA (MR) MICROBIOLÓGICOS

Escherichia coli

Nº do frasco: _____ Início da análise: ___/___/___

Metodologia Utilizada: _____

CONTROLE DA ETAPA DE ENRIQUECIMENTO SELETIVO / PRESUNTIVO: (caso seja aplicado na metodologia)

Meio Utilizado	Características esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Obs: _____

CONTROLE DA ETAPA DE CONFIRMAÇÃO PARA COLIFORMES TOTAIS: (caso seja aplicado na metodologia)

Meio Utilizado	Características esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Obs: _____

CONTROLE DA ETAPA DE CONFIRMAÇÃO PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES: (caso seja aplicado na metodologia)

Meio Utilizado	Características coloniais esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Obs: _____

CONTROLE DA ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA: (caso seja aplicado na metodologia)

Meio Utilizado	Características esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Caso seja realizada a sorologia informar no campo observação.

Obs: _____

Resultado da utilização do MR:

O MR apresentou as características de uma cepa de referência de *Escherichia coli*?

() SIM () NÃO

Término da análise: ___/___/___

POP 65.1101.006 – Anexo C – Rev. 01

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



FORMULÁRIO PARA O ACOMPANHAMENTO DO USO
 DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA (MR) MICROBIOLÓGICOS

Listeria monocytogenes

Nº do frasco: _____ Início da análise: ___/___/___

Metodologia Utilizada: _____

CONTROLE DA ETAPA DE ISOLAMENTO:

Meio Utilizado	Características coloniais esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Obs: _____

CONTROLE DA ETAPA DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA:

Meio Utilizado	Características esperadas?	Resultado com o MR Satisfatório/Insatisfatório
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat
	() Sim () Não	(...)Sat ()Insat

Caso seja realizado o teste da sorologia polivalente informar no campo observação.

Obs: _____

Resultado da utilização do MR:

O MR apresentou as características de uma cepa de referência de *Listeria monocytogenes*?

() SIM () NÃO

Término da análise: ___/___/___

POP 65.1101.006 – Anexo C – Rev. 01

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br

APÊNDICE D - CERTIFICADOS DOS MATERIAIS DE REFERÊNCIA

Salmonella



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

INCQS-MRCA03

INCQS 03/2018R02

Número do Certificado

COMISSÃO DO PROGRAMA DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS EM ALIMENTOS

INCQS/FIOCRUZ

Identificação do Item

Material de Referência Certificado (MRC): *Salmonella* Typhimurium

Certificador: INCQS-Fiocruz/Comissão do Programa de Materiais de Referência
Certificados em Alimentos

Código do Lote: INCQS-MRCA03

Apresentação do Material: 1 frasco contendo (1,0 ± 0,1) g de material liofilizado

Condições de Estocagem: Manter em *freezer*, à temperatura igual ou inferior a -20 °C

Caracterização do Material: Realizada em fevereiro de 2018

Data de Emissão do Certificado: 26/02/18


Marcus H. C. de la Cruz
Coordenador Técnico da CPMRA


Marcelo L. Brandão
Coordenador da Qualidade da CPMRA


Carla de O. Rosas

Responsável pelo Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia

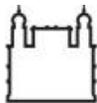
O MRC e seu CERTIFICADO atendem aos requisitos dos guias ABNT ISO GUIA 31, ABNT ISO GUIA 34, ABNT ISO GUIA 35, NIT-DICLA-061 e das normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 e ABNT NBR ISO 17034 Este CERTIFICADO é apenas válido para o item acima, não sendo extensivo a quaisquer outros e somente pode ser reproduzido de forma integral.

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br

INCQS 03/2018R02

Página 1 de 6



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde****Descrição do MRC**

Este material de referência foi preparado utilizando-se um isolado de *Salmonella* Typhimurium obtido de amostra de alimentos envolvida em surtos de Doença Transmitida por Alimentos (DTA), ocorrida no território brasileiro, no ano de 2014. O isolado foi fornecido pelo Laboratório de Referência Nacional de Enterobactérias (LABENT) do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Anteriormente ao preparo do lote, foi realizada a identificação fenotípica, genotípica e a caracterização molecular do isolado pelo Método *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Para a seleção do isolado foi empregada a metodologia do MALDI-TOF, que em um estudo anterior, entre perfis proteômicos, apontou similaridade entre o isolado utilizado no preparo do MRC com a cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para o preparo do material, células bacterianas foram concentradas e ressuspensas em leite desnatado estéril. A suspensão foi homogeneizada, distribuída em frascos, liofilizada e estocada à temperatura de -70 °C.

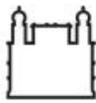
Posteriormente ao preparo do lote, foram aplicados testes de controle com o isolado bacteriano utilizado no preparo do MRC e com oito unidades do lote produzido, a fim de se verificar a identidade fenotípica e genotípica, assim como a caracterização molecular da bactéria utilizada na produção do material.

Metodologia Utilizada no Estudo de Estabilidade e Homogeneidade do Material

Foi empregada a metodologia de contagem em placas utilizando uma camada base de ágar tripticaseína de soja contendo 0,6% de extrato de levedura, com posterior adição de uma sobrecamada de ágar cristal violeta vermelho neutro bile glicose (VRBG), segundo metodologia descrita por Kornachi & Johnson (2001).

Metodologia Utilizada na Caracterização do Material de Referência

Os ensaios analíticos referentes à caracterização qualitativa do MRC ocorreram em um laboratório do INCQS/Fiocruz. O laboratório procedeu à verificação qualitativa comparando oito unidades do lote utilizando as metodologias de identificação fenotípica, identificação genotípica, tipificação molecular pelos métodos do *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e da *Random Amplification of Polimorphic DNA* (RAPD). Foi também realizado o sequenciamento do gene STM 4497.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Identificação fenotípica:

Foi utilizado o sistema automatizado VITEK 2.0, que se baseia na identificação de espécies bacterianas, a partir da ação enzimática do micro-organismo frente a substratos bioquímicos liofilizados presentes em cartão "GN", de uso específico do referido equipamento.

Identificação genotípica:

A identificação genotípica foi realizada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), segundo metodologia descrita por Kim et al (2006), com alvo no gene STM4497, cromossomal, comum ao sorovar *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium.

Tipificação Molecular pelo Método do *Multilocus Sequence Typing* (MLST):

Foi realizada a tipificação, segundo a metodologia do MLST, fundamentada no acompanhamento de possíveis variações em fragmentos específicos de sete genes constitutivos conservados distribuídos pelo cromossomo bacteriano, responsáveis pela codificação de enzimas essenciais ao metabolismo celular e comuns entre seres de uma espécie. Para a metodologia do MLST de *S. enterica* foram seguidas as orientações do banco de dados: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica.relacionadas>.

Tipificação Molecular pelo Método *Random Amplification of Polimorphic DNA* (RAPD):

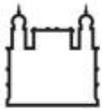
Para a caracterização molecular foi também empregada a metodologia do RAPD, que utiliza pequenos iniciadores que se ligam à sequências nucleotídicas arbitrárias (WILLIAMS et al, 1990). A proximidade, número e localização dessas sequências variam entre organismos sendo esses marcadores eficazes na identificação de polimorfismo no DNA genômico entre indivíduos de uma mesma espécie. Os perfis de fragmentos gerados definem o fingerprinting dos DNA avaliados (POWER, 1996).

Sequenciamento do gene STM4497

O produto da reação da PCR com o gene STM4497 de uma unidade do lote foi purificado, sequenciado segundo Sanger, pela Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC, no Analisador Automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, USA), de acordo com o protocolo de Otto et al (2008). Posteriormente, a partir da utilização do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), foi comparada a sequência dos nucleotídeos obtidas com

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



sequências depositadas no *GenBank database* e calculada a significância estatística das correlações obtidas.

Finalidade de Uso

Este MRC é indicado para os seguintes propósitos:

- Ensaios qualitativos de **detecção** de *Salmonella* spp.;
- Em metodologias oficiais que descrevam a utilização de uma cepa de referência de *Salmonella* spp para o controle de ensaios.

Armazenagem e Manipulação

Este MRC deve ser armazenado em local protegido contra a incidência da luz e em temperatura igual ou inferior a -20 °C (*freezer*), preferencialmente a -70 °C, até o momento de uso.

O MRC deverá ser manipulado em ambiente laboratorial, em condições assépticas e utilizado por profissional que apresente conhecimento de técnicas de manipulação de micro-organismos e de biossegurança.

Reconstituição do MRC

Reconstituir o material com 1 mL de meio rico líquido, tais como caldo infusão cérebro coração (BHI) ou caldo tripticaseína de soja (TSB), **utilizando todo o volume do frasco, em uma única vez.**

O material deverá ser usado para o preparo de culturas bacterianas, que poderão ser utilizadas para uso direto, ou preferencialmente para o preparo de alíquotas destinadas a criopreservação. Deverá ser obedecida a quantidade de repiques a serem aplicados ao material, **não ultrapassando cinco passagens**, contadas a partir da reconstituição do liofilo (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2016).

Informações Sobre Segurança

A bactéria presente no material é classificada como classe de risco biológico II, apresentando risco individual moderado. Deve ser evitado contato direto do material com mucosas ou pele não íntegra.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


Valores de Referência e Grau de Confiança

Na Tabela 1 são apresentados os valores de referência e os graus de confiança para as análises qualitativas das unidades do lote INCQS-MRCA03 analisadas.

Tabela 1 – Valores de referência (V_{ref}) e graus de confiança

S. Typhimurium	V_{ref}	Grau de Confiança
Vitek 2.0 (bioquímica)	Identificação Satisfatória para as unidades do lote avaliadas	93-99%
PCR (molecular)	Amplificação do gene STM4497 com fragmentos de 310pb para as unidades do lote avaliadas	95% (Estimado)
MLST (molecular)	Perfis de alelos dos genes: <i>aroC</i> 10; <i>dnaN</i> 07; <i>hemD</i> 12; <i>hisD</i> 11; <i>purE</i> 05, <i>sucA</i> 09 e <i>thrA</i> 02. *Tipo sequencial 19 e complexo clonal 01 para as unidades do lote avaliadas	95% (Estimado)
RAPD (Primer OPA3)	Mesmo perfil de bandas para as unidades do lote avaliadas	95% (Estimado)
Comparação da sequência de DNA que codifica o gene STM 4497, com sequências do Genbank	(Genbank Accession nº MG924931) para a unidade do lote avaliada	99 %

*Classificação segundo informações do banco de dados do MLST para *S. enterica* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica.relacionadas>).

Rastreabilidade Metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrologica garantida por uso das bactérias de referência: *Salmonella enterica* subsp. *entérica* serovar Typhimurium ATCC 14028 e *Salmonella enterica* subsp. *entérica* serovar Typhimurium ATCC 13311 e na calibração dos equipamentos utilizados nas análises qualitativas .

Prazo de Validade

Este MRC tem seu prazo de validade até o **dia 04 de dezembro de 2018, desde que armazenado a temperaturas iguais ou inferiores à -20°C**. Após esse período, conforme os resultados do monitoramento, esse prazo poderá ser redefinido.

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIUCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



O INCQS assegura a integridade deste MRC até o momento da abertura do recipiente de vidro onde está acondicionado, desde que as condições de armazenagem e manipulação sejam obedecidas.

Referências

- [1] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR/ISO GUIA NBR/ISO/IEC 17025. "Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração". Rio de Janeiro, **2005**.
- [2] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 31, "Materiais de Referência - Conteúdo de Certificados e rótulos", Rio de Janeiro, **2004**.
- [3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 34, "Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência". Rio de Janeiro, **2012**.
- [4] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 35, "Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação". Rio de Janeiro, **2012**.
- [5] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). ABNT NBR ISO 17034. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, **2017**.
- [6] EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Tests. In: European Pharmacopoeia 8.0, v.1, 01/2014: 2.6.12, 2.6.13. Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, **2013**.
- [7] HARBOTTLE, H.; *et al.* "Comparison of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Antimicrobial Susceptibility Typing for Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolates", *Journal of Clinical Microbiology*. v. 44, n. 7, p. 2449–2457, **2006**.
- [8] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. NIT-DICLA-61: Requisitos sobre a Acreditação dos Laboratórios de Ensaio e dos Produtores de Material de Referência dos Centros de Recursos Biológicos. Rio de Janeiro, **2012**.
- [9] KIM, H.J.; PARK, S.H.; KIM, H.Y. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and nonLT2 *Salmonella* genomic sequences, and genotyping of salmonellae by using PCR. *Appl Environ Microbiol* v.72, p.6142–6151, **2006**.
- [10] KORNACHI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4^o ed., **2001**. Washington, D.C.: APHA – Chapter 8, p. 69-82.
- [11] POWER, E.G.M. RAPD typing in microbiology a technical review. **Journal of Hospital Infection**, v. 34, n. 247-265, 1996.
- [12] UNITED STATES Pharmacopoeia. Microbiological Tests. USP 39-NF 34: 2016. Rockville: U.S. Pharmacopeia, **2016**. 1 v.
- [13] VERSALOVIC, J; KOEUTH, T; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* v. 19, p. 6823-6831, **1991**.
- [14] WILLIAMS, J.G.K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

COMITÊ TÉCNICO: Carla de Oliveira Rosas, Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso, Marcelo Luiz Lima Brandão, Sílvia Maria dos Reis Lopes, Valéria de Mello Medeiros.

Listeria monocytogenes

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO
INCQS-MRCA02**

INCQS 02/2018R02

Número do Certificado

COMISSÃO DO PROGRAMA DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS EM ALIMENTOS
INCQS/FIOCRUZ

Identificação do Item**Material de Referência Certificado (MRC):** *Listeria monocytogenes*

Certificador: INCQS-Fiocruz/Comissão do Programa de Materiais de Referência
Certificados em Alimentos

Código do Lote: INCQS-MRCA02

Apresentação do Material: 1 frasco contendo (1,0 ± 0,1) g de material liofilizado

Condições de Estocagem: Manter em freezer, à temperatura igual ou inferior a -20 °C

Caracterização do Material: Realizada em fevereiro de 2018

Data de Emissão do Certificado: 24/02/2018


Marcus H. C. de la Cruz
Coordenador Técnico da CPMRA


Marcelo L. Brandão
Coordenador da Qualidade da CPMRA


Carla de O. Rosas

Responsável pelo Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia

O MRC e seu CERTIFICADO atendem aos requisitos dos guias ABNT ISO GUIA 31, ABNT ISO GUIA 34, ABNT ISO GUIA 35, NIT-DICLA-061 e das normas ABNT NBR ISO/IEC 17025 e ABNT NBR ISO 17034. Este CERTIFICADO é apenas válido para o item acima, não sendo extensivo a quaisquer outros e somente pode ser reproduzido de forma integral.

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br

INCQS 02/2018 R02



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**Descrição do MRC**

Este material de referência foi preparado utilizando-se um isolado de *Listeria monocytogenes* obtido a partir de amostras de cortes de frango cru em análise realizada no Setor de Alimentos do departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

Anteriormente ao preparo do lote, foi verificada a identificação fenotípica, genotípica e a caracterização molecular pelo Método *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Para a seleção do isolado foi empregada a metodologia do MALDI-TOF, que em um estudo anterior entre perfis proteômicos apontou similaridade entre o isolado utilizado no preparo do MRC com a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Para o preparo do material, células bacterianas foram concentradas e ressuspensas em leite desnatado estéril. A suspensão foi homogeneizada, distribuída em frascos, liofilizada e armazenada à temperatura de -70 °C.

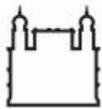
Posteriormente ao preparo do lote, foram aplicados testes de controle com o isolado bacteriano utilizado no preparo do MRC e com oito unidades do lote produzido, a fim de se verificar a identidade fenotípica e genotípica, assim como a caracterização molecular da bactéria utilizada na produção do material.

Metodologia Utilizada no Estudo de Estabilidade e Homogeneidade do Material de Referência

Foi utilizada a metodologia de contagem de *Listeria monocytogenes* em placas utilizando uma camada base de ágar tripticaseína de soja contendo 0,6% de extrato de levedura. Com posterior adição de uma sobrecamada de ágar Cromogênico para *Listeria* (HITCHINS; JINNEMANE; CHEN, 2017).

Metodologias Utilizadas na Caracterização do Material de Referência

Os ensaios analíticos referentes à caracterização qualitativa do MRC ocorreram em um laboratório do INCQS/FIOCRUZ. O laboratório procedeu à verificação qualitativa de oito unidades do lote utilizando as metodologias de identificação fenotípica, identificação genotípica, tipificação molecular pelos métodos do *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e do da *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR). Foi também realizado o sequenciamento do gene *InlAB*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**Identificação fenotípica:**

Foi utilizado o teste bioquímico miniaturizado de identificação Api *Listeria*, que se baseia na ação enzimática do micro-organismo frente a substratos bioquímicos liofilizados presentes no kit, que permite a identificação de espécies representantes do gênero *Listeria*.

Identificação genotípica:

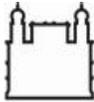
A identificação genotípica foi realizada pela técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), segundo metodologia descrita por Jung et al (2003), com alvo nos gene cromossomal *InlAB*.

Tipificação Molecular pelo Método do *Multilocus Sequence Typing* (MLST):

Foi realizada a tipificação, segundo a metodologia do MLST, fundamentada no acompanhamento de possíveis variações em fragmentos específicos de sete genes constitutivos conservados, distribuídos pelo cromossomo bacteriano, responsáveis pela codificação de enzimas essenciais ao metabolismo celular e comuns entre seres de uma espécie. Para a metodologia do MLST de *L. monocytogenes* foram seguidas as orientações do banco de dados: <http://bigsdb.pasteur.fr/listeria/listeria.html>.

Tipificação Molecular pelo Método *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR):

Para a caracterização foi também empregada a metodologia do ERIC-PCR, que utiliza como iniciadores elementos repetitivos (ERIC) distribuídos no genoma bacteriano. As regiões localizadas entre os elementos são amplificadas, produzindo diferentes padrões de bandas, que variam entre espécies. A metodologia foi realizada seguindo os procedimentos descritos por Versalovic, Koeth e Lupski (1991), com a utilização do primer ERIC 2.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


Sequenciamento do gene *InIAB*

Os produtos da reação da PCR com o gene *InIAB* foram purificados, sequenciados segundo Sanger, pela Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC, no Analisador Automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, USA), de acordo com o protocolo de Otto et al (2008). Posteriormente, a partir da utilização do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), foi comparada a sequência dos nucleotídeos obtidas com sequências depositadas no *GenBank databases* calculada a significância estatística das correlações obtidas.

Finalidade de Uso

Este MRC é indicado para os seguintes propósitos:

- Ensaios qualitativos cuja detecção e **identificação** de *Listeria monocytogenes* é condição requerida; e
- Em metodologias oficiais que descrevam a utilização de uma cepa de *L. monocytogenes* para o controle de ensaios.

Armazenagem e Manipulação

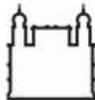
Este MRC deve ser armazenado em local protegido contra a incidência da luz e em temperatura igual ou inferior a -20 °C (*freezer*), preferencialmente a -70 °C, até o momento de uso.

O MRC deverá ser manipulado em ambiente laboratorial, em condições assépticas e utilizado por profissional que apresente conhecimento de técnicas de manipulação de micro-organismos e de biossegurança.

Reconstituição do MRC

Reconstituir o material com 1 mL de caldo tripticaseína de soja contendo 0,6% de extrato de levedura, **utilizando todo o volume do frasco, em uma única vez.**

O material deverá ser usado para o preparo de culturas bacterianas, que poderão ser utilizadas para uso direto, ou preferencialmente para o preparo de alíquotas destinadas a criopreservação. Deverá ser obedecida a quantidade de repiques a serem aplicados ao material, **não ultrapassando cinco passagens**, contadas a partir da reconstituição do líofilo (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2016).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


Informações Sobre Segurança

A bactéria presente no material é classificada como classe de risco biológico II, apresentando risco individual moderado. Deve ser evitado contato direto do material com mucosas ou pele não íntegra.

Valores de Referência e Grau de Confiança

Na Tabela 1 são apresentados os valores de referência e os graus de confiança para as análises qualitativas do material de referência do Lote INCQS-MRCA02.

Tabela 1 – Valores de referência (V_{ref}) e graus de confiança

S. Typhimurium	V_{ref}	Grau de Confiança
Api Listeria	Identificação Satisfatória (Código de identificação: 6510) para as unidades do lote analisadas	98,9%
PCR (molecular)	Amplificação do gene <i>InlAB</i> com fragmentos de 902 pb para as unidades do lote analisadas	95% (Estimado)
MLST (molecular)	Perfis de alelos dos genes: <i>abcZ</i> 07; <i>bglA</i> 06; <i>cat</i> 10; <i>dapE</i> 06; <i>dat</i> 01; <i>ldh</i> 02 e <i>lhkA</i> 01 *Tipo sequencial 11 e complexo clonal 11 para as unidades do lote analisadas	95% (Estimado)
ERIC-PCR (Primer ERIC 2)	Mesmo perfil de bandas para as unidades do lote analisadas	95% (Estimado)
Comparação da sequência de DNA que codifica o gene <i>InlAB</i> , com sequências do Genbank	(Genbank Accession nº MG924932) para a unidade do lote analisada	99%

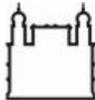
*Classificação segundo informações do banco de dados do MLST para *L. monocytogenes* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/listeria/listeria.html>).

Rastreabilidade Metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida por uso das bactérias de

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21040-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel (21) 3865-5151 Fax (21) 2290-0915

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde


referência: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Listeria monocytogenes* ATCC BAA 751, no controle positivo das metodologias da Tabela 1.

Prazo de Validade

Este MRC tem seu prazo de validade até o **dia 04 de dezembro de 2018 desde que armazenado a temperaturas iguais ou inferiores à -20°C**. Após esse período, conforme os resultados do monitoramento, esse prazo poderá ser redefinido.

O INCQS assegura a integridade deste MRC até o momento da abertura do recipiente de vidro onde está acondicionado, desde que as condições de armazenagem e manipulação sejam obedecidas.

Referências

- [1] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT NBR ISO/IEC 17025. “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração”. Rio de Janeiro, **2005**.
- [2] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 31, “Materiais de Referência - Conteúdo de Certificados e rótulos”, Rio de Janeiro, **2004**.
- [3] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 34, “Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência”. Rio de Janeiro, **2012**.
- [4] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ISO GUIA 35, “Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação”. Rio de Janeiro, **2012**.
- [5] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT NBR ISO/IEC 17034, “Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência”. Rio de Janeiro, **2017**.
- [6] EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Tests. In: European Pharmacopoeia 8.0, v.1, 01/2014: 2.6.12, 2.6.13. Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, **2013**.
- [7] HITCHINS, A.D.; JINNEMAN, K.; CHEN, Y. “Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Bacteriological Analytical Manual Online”; FDA, Chapter 10, Revision march **2017**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>. Acesso em: 28 de setembro de 2017.
- [8] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. NIT-DICLA-61: Requisitos sobre a Acreditação dos Laboratórios de Ensaio e dos Produtores de Material de Referência dos Centros de Recursos Biológicos. Rio de Janeiro, 2012.
- [9] JUNG, Y.S. et al. “Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB”; *J. Food Protect*, v.66, p.237–241, **2003**.
- [10] UNITED STATES Pharmacopoeia. Microbiological Tests. USP 39-NF 34: 2016. Rockville: U.S. Pharmacopeia, **2016**. 1 v.
- [11] VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. “Distribution of repetitive DNA sequences in eubacterial and application to fingerprinting of bacterial genomes”, *Nucleic Acids Res*, v. 19, p. 6823-6831, **1991**.
- [12] WANG Y. et al. Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China. *BMC Microbiology*. v.12, n.119, p.1-9, **2012**.

COMITÊ TÉCNICO: Carla de Oliveira Rosas, Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso, Marcelo Luiz Lima Brandão, Sílvia Maria dos Reis Lopes, Valéria de Mello Medeiros.

ANEXO A - SuperSpectras - MALDI-TOF

Estirpes de *Salmonella*

supermass	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	matches
1	3004	10				10	10	10		10	10		10	10		10	10				10
2	3012					2					2										2
3	3035						6		6	6				6		6		6			6
4	3039	9	9		9	9	9			9	9	9			9						9
5	3048			8	8		8	8				8			8	8					8
6	3054					4								4		4					4
7	3061				1																1
8	3068					1															1
9	3080	14	14	14	14	14	14			14	14	14	14	14		14			14	14	14
10	3121						1														1
11	3128	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16		16		16	16			16	16	16
12	3139	15	15	15	15	15		15	15	15	15		15		15	15	15			15	15
13	3149	14	14	14	14	14			14	14	14			14	14		14	14			14
14	3159	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16				16	16
15	3168	12			12		12	12	12	12	12			12	12	12				12	12
16	3175	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17				17	17
17	3185																				2
18	3192	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		17				17	17
19	3201														1						1
20	3242		15	15	15	15	15	15	15	15	15		15		15	15			15	15	15
21	3253																				1
22	3265					11	11	11	11	11	11			11		11	11	11	11		11
23	3302																				1
24	3315			1																	1
25	3325														1						1
26	3366	13	13	13		13		13	13	13	13		13	13		13			13	13	13
27	3366	2											2								2
28	3398		8	8	8	8	8		8		8			8		8				8	8
29	3410					6	6		6					6			6	6			6
30	3413	14		14	14	14	14	14	14	14	14		14	14		14		14	14	14	14
31	3421															2					2
32	3429	11	11	11		11	11	11	11			11	11						11	11	11
33	3440				10	10	10		10		10	10		10	10					10	10
34	3451		8	8	8	8		8		8	8			8						8	8
35	3482		7	7	7	7		7		7				7		7				7	7
36	3478			3		3														3	3
37	3481			5	5					5	5									5	5
38	3495			3				3			3									3	3
39	3514	2											2								2
40	3545													3		3				3	3
41	3555									4	4						4	4			4
42	3560						7		7		7		7	7	7		7	7			7
43	3560	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18		18	18	18	18
44	3567				7				7		7		7	7	7		7	7			7
45	3591	17	17	17		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
46	3600	12	12	12	12	12	12		12		12	12	12	12		12				12	12
47	3609	9		9	9					9			9	9	9	9					9
48	3619		2																	2	2
49	3631	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18			18	18	18
50	3639												4	4			4	4			4
51	3643	13		13	13	13	13		13		13	13	13	13	13		13				13
52	3653	9		9	9		9	9			9	9	9							9	9
53	3664	4		4																4	4
54	3683					2					2										2
55	3739		8	8		8				8			8		8	8				8	8
56	3746	7		7		7			7		7					7				7	7
57	3765																				1
58	3782																				1
59	3828	12	12	12	12	12		12	12	12		12		12				12	12		12
60	3834					6	6	6	6		6			6							6
61	3848									4					4		4			4	4
62	3860	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18		18	18	18	18			18	18	18
63	3868													1							1
64	3874				1																1
65	3881	3											3						3		3
66	3897													1							1
67	3924											1									1
68	3966								4			4								4	4
69	3974													1							1
70	3982					2														2	2
71	3996					3										3				3	3
72	4008													1							1
73	4052							3					3							3	3
74	4061	14	14	14	14	14	14	14		14	14		14	14		14			14	14	14
75	4076	8	8	8		8				8			8				8				8
76	4086	1																			1
77	4094				1																1
78	4145																				1
79	4152																				1
80	4165	17		17	17	17	17	17	17	17	17		17	17	17	17			17	17	17
81	4180									5				5		5	5				5
82	4186	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18			18	18	18

Estirpes de *E. coli*

	supermass	EC 84			E. coli ATCC 25922												matches
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	3000								1								1
2	3005	6		6			6	6		6			6				6
3	3020		6		6	6					6		6	6			6
4	3023	8		8		8	8			8		8	8	8			8
5	3050														1		1
6	3063						1										1
7	3075		12	12		12	12	12		12	12	12	12	12	12	12	12
8	3128	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
9	3138	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
10	3150		12		12	12	12	12	12	12	12	12		12			12
11	3158	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
12	3168	10	10	10	10	10		10	10	10	10						10
13	3178	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
14	3179	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
15	3184	15	15	15	15	15	15	15	15	15			15	15	15	15	15
16	3191					2							2				2
17	3198					1											1
18	3206	14	14	14	14	14	14		14	14	14	14	14	14	14	14	14
19	3228										1						1
20	3247	5	5	5						5			5				5
21	3254	9	9	9		9	9			9		9	9		9		9
22	3273						1										1
23	3296												1				1
24	3320															1	1
25	3327									2			2				2
26	3333															1	1
27	3340		2					2									2
28	3379	10	10		10	10	10		10	10	10	10		10			10
29	3397			3										3	3		3
30	3403						1										1
31	3411	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		13	13	13		13
32	3424			6	6			6					6	6	6		6
33	3434	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
34	3439			7	7					7	7		7	7	7		7
35	3449		8	8	8		8		8			8	8	8			8
36	3455			3			3								3		3
37	3458					3				3					3		3
38	3463			5				5					5	5	5		5
39	3474			4			4		4						4		4
40	3482											1					1
41	3490									1							1
42	3497								1								1
43	3560	7			7		7		7	7		7				7	7
44	3565	5	5			5				5	5						5
45	3580	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
46	3591	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
47	3599	10	10	10			10			10	10	10	10	10	10		10
48	3617		2	2													2
49	3629														1		1
50	3638	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
51	3649	8	8	8	8		8			8			8		8		8
52	3658			2									2				2
53	3725					2							2				2
54	3732	7	7	7			7	7					7		7		7
55	3741	10	10	10		10	10			10		10		10			10
56	3818	15	15	15		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
57	3832	8	8		8		8	8		8		8			8		8
58	3853	11	11	11		11		11		11	11		11		11	11	11
59	3862												1				1
60	3876												1				1
61	3912		3				3					3					3
62	3918									2						2	2
63	3936	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
64	3948	7	7	7	7		7			7	7						7
65	3956	5	5				5	5									5
66	4011									2					2		2
67	4058	10	10	10		10	10	10				10	10		10		10
68	4073	5	5			5	5								5		5
69	4079		4	4	4							4					4
70	4141														1		1
71	4164	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
72	4176	4		4									4		4		4
73	4185	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
74	4196	9	9	9	9	9	9			9			9		9		9
75	4206				3						3	3					3

ANEXO B - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS CBRS

Caracterização bioquímica do CBR S.Typhimurium realizada no equipamento VITEK 2.0

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade por	Resultado
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,0384	neg
3	ADONITOL	ADO	0,1875	neg
4	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA	0,0180	neg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3000	neg
7	D-CELOBIOSE	dCEL	0,3000	neg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,0360	neg
10	PRODUÇÃO DE H ₂ S	H ₂ S	0,0024	+
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408	neg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324	neg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3000	+
14	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228	neg
15	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF	0,4500	+
17	BETA-GLUCOSIDADE	BGLU	0,0360	neg
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3000	+
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875	+
20	D-MANOSE	dMNE	0,3000	+
21	BETA-XILOSIDADE	BXYL	0,0324	neg
22	BETA-alanina arilamidase pNA	Balap	0,0174	neg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234	neg
26	LIPASE	LIP	0,0192	neg
27	PALATINOSE	PLE	0,3000	neg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276	+
31	UREASE	URE	0,1500	neg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875	+
33	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3000	neg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3000	+
35	D-TREALOSE	dTRE	0,3000	+
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0,0540	+
37	MALONATO	MNT	0,1500	neg
39	5-QUETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3000	neg
40	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,1500	neg
41	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,0360	neg
42	Alcalinização SUCINATO	SUCT	0,1500	+
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306	neg
44	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,0360	+
45	FOSFATASE	PHOS	0,0504	+
46	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	GlyA	0,0120	neg
47	ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC	0,3000	+
48	LISINA DESCARBOXILASE	LDC	0,1500	+
53	Assimilação L-HISTIDINA	IHISa	0,0870	neg
56	CUMARATO	CMT	0,1260	+
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0378	neg
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp. vibrio.)	O129R	0,0105	neg
59	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA	0,0576	neg
61	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,0420	neg
62	ELLMAN	ELLM	0,0300	neg
64	Assimilação L-LACTATO	ILATa	0,1860	neg

+ - positivo, neg - negativo

Caracterização bioquímica do CBR *E. coli* realizada no equipamento VITEK 2.0

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade	Resultado
2	Ala-Fe-Pro-ARILAMIDASE	APPA	0,0384	neg
3	ADONITOL	ADO	0,1875	neg
4	L-Pirrolidonil - ARILAMIDASE	PyrA	0,0180	neg
5	L-ARABITOL	IARL	0,3000	neg
7	D-CELOBIOSE	dCEL	0,3000	neg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,0360	+
10	PRODUÇÃO DE H ₂ S	H ₂ S	0,0024	neg
11	BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0,0408	neg
12	Glutamil Arilamidase pNA	AGLTp	0,0324	neg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0,3000	+
14	GAMA-GLUTAMIL-TRANSFERASE	GGT	0,0228	neg
15	FERMENTAÇÃO/GLUCOSE	OFF	0,4500	+
17	BETA-GLUCOSIDADE	BGLU	0,0360	neg
18	D-MALTOSE	dMAL	0,3000	+
19	D-MANITOL	dMAN	0,1875	+
20	D-MANOSE	dMNE	0,3000	+
21	BETA-XILOSIDADE	BXYL	0,0324	neg
22	BETA-alanina arilamidase pNA	Balap	0,0174	neg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234	+
26	LIPASE	LIP	0,0192	neg
27	PALATINOSE	PLE	0,3000	neg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276	+
31	UREASE	URE	0,1500	neg
32	D-SORBITOL	dSOR	0,1875	+
33	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3000	+
34	D-TAGATOSE	dTAG	0,3000	neg
35	D-TREALOSE	dTRE	0,3000	+
36	CITRATO (SODIO)	CIT	0,0540	neg
37	MALONATO	MNT	0,1500	neg
39	5-QUETO-D-GLUCONATO	5KG	0,3000	+
40	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,1500	+
41	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,0360	neg
42	Alcalinização SUCINATO	SUCT	0,1500	+
43	Beta-N-ACETIL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0,0306	neg
44	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,0360	+
45	FOSFATASE	PHOS	0,0504	(neg)
46	Assimilação Glicina ARILAMIDASE	GlyA	0,0120	neg
47	ORNITINA DESCARBOXILASE	ODC	0,3000	neg
48	LISINA DESCARBOXILASE	LDC	0,1500	+
53	Assimilação L-HISTIDINA	IHISa	0,0870	neg
56	CUMARATO	CMT	0,1260	+
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0,0378	(neg)
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp. vibrio.)	O129R	0,0105	+
59	Glu-Gli-Arg-ARILAMIDASE	GGAA	0,0576	neg
61	Assimilação L-MALATO	IMLTa	0,0420	neg
62	ELLMAN	ELLM	0,0300	+
64	Assimilação L-LACTATO	ILATa	0,1860	neg

+ - positivo, neg – negativo, (neg) – falso negativo

Caracterização bioquímica do CBR *L. monocytogenes* a partir do kit api
Listreia

Teste	Mnemónica	Quantidade [mg/cúb]	Resultado bioquímico
Esculina Citrato de ferro	ESC	0,106	+
4-nitrofenil- α D-manopiranosido	α MAN	0,045	+
D-Arabitól	DARL	0,400	+
D-Xylose	XYL	0,400	neg
L-Rhamnose	RHA	0,400	+
Metil- α D-glucopiranosido	MDG	0,400	+
D-Ribose	RIB	0,400	neg
Glucose-1-Fosfato	G1P	0,400	neg
D-Tagatose	TAG	0,400	neg
Hemólise (Complementar)	HEM	-----	β hemólise fraca

+ - positivo, neg – negativo.