

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

Ingrid Camelo da Silva

**PRODUÇÃO DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA CONTENDO
BACTÉRIAS EM MATRIZ FRANGO**

Rio de Janeiro

2019

Ingrid Camelo da Silva

**PRODUÇÃO DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA CONTENDO
BACTÉRIAS EM MATRIZ FRANGO**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Marcelo Luiz Lima Brandão
Preceptora: Valéria de Mello Medeiros

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Silva, Ingrid Camelo da

Produção de itens de ensaio de proficiência contendo bactérias em matriz frango. / Ingrid Camelo da Silva. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

47 f.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Tutor: Marcelo Luiz Lima Brandão.

Preceptora: Valéria de Mello Medeiros.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Itens de ensaio. 2. Controle de Qualidade. 3. Carne de frango.

PRODUCTION OF PROFICIENCY TEST ITEMS CONTAINING
BACTERIA IN CHICKEN MATRIX.

Ingrid Camelo da Silva

**PRODUÇÃO DE ITENS DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA CONTENDO
BACTÉRIAS EM MATRIZ FRANGO**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em 21/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Cátia Cardoso da Silva (Mestre)
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Marcelo Luiz Lima Brandão (Doutor) – Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar essa conquista.

Ao meu pai e irmã Dayse pelo apoio.

Ao meu namorado Yago pelo apoio incansável, respeito e companheirismo.

Aos amigos que estiveram presentes e me apoiaram durante o curso de residência.

A todos os que compõem o Setor de Alimentos e aqueles que já se foram, mas que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, especialmente à Carla Rosas, que me recebeu e me acolheu sempre com carinho.

Ao meu tutor Marcelo Brandão pela orientação e por todo o conhecimento transmitido.

À minha preceptora Valéria Medeiros por ter me instruído em todas as atividades com zelo e por todo companheirismo.

Ao Setor de Meio de Cultura e Central de Esterilização por serem solícitos e eficientes nas atividades que compuseram este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS pela oportunidade de realização deste curso.

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Em muitos países, durante as últimas duas décadas, têm emergido como um crescente problema econômico e de saúde pública. Há previsões de que o problema aumente no século XXI, especialmente com as várias mudanças globais, incluindo crescimento da população, pobreza e exportação de alimentos, que influenciam a segurança de alimentos no âmbito internacional. Os laboratórios de análises microbiológicas de alimentos têm importante papel no âmbito de controle da qualidade higiênico-sanitária. Para tanto, é preciso que haja comprovação da qualidade analítica, de modo a evitar resultados incorretos, principalmente nos laboratórios municipais e estaduais que analisam amostras referentes a surtos de DTA. Uma ferramenta de qualidade utilizada para avaliar a confiabilidade dos resultados que estão sendo produzidos e complementar os procedimentos internos de controle da qualidade é a participação em ensaios de proficiência (EP), preconizada pela norma ABNT ISO 17025 – norma internacional de competência para laboratórios de ensaio. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é um dos poucos provedores que desenvolve e coordena EP no Brasil na área de microbiologia de alimentos. O objetivo desse trabalho foi produzir lotes de itens de ensaio (IE) para utilização em EP quantitativos – um lote contendo *Escherichia coli* e outro contendo *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* concomitantemente – e qualitativo, lote contendo *Salmonella* spp. Todos os lotes foram produzidos em matriz frango desfiado cozido. Como esse alimento não havia sido utilizado para produção de IE anteriormente, foi necessário produzir lotes piloto para avaliar a viabilidade. Portanto, foram produzidos três lotes piloto e, posteriormente, três lotes finais empregando a mesma metodologia. A matriz foi distribuída em frascos para liofilização, contaminados com as bactérias alvo em concentrações específicas e submetidos à liofilização, como técnica de preservação. Durante o preparo, foram utilizados crioprotetores, sacarose e trealose, visando uma maior estabilidade dos IE frente aos processos de estresse para os micro-organismos, como congelamento e liofilização. Todos os lotes foram considerados suficientemente homogêneos, segundo Protocolo Harmonizado, e estáveis, de acordo com a ABNT ISO GUIA 35:2012, à temperatura de $\leq (-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$ por todo período estudado, com exceção do lote final contendo *B. cereus* e *S. aureus*, o qual teve uma queda proeminente da concentração de *B. cereus* após 49 dias de armazenamento, inviabilizando a utilização deste lote em um EP. Foi realizado estudo de estabilidade a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ por quatro

dias nos outros dois lotes finais que apresentaram resultado satisfatório no estudo de estabilidade a $\leq (-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$, a fim de simular temperaturas os quais possam ser expostos no processo de transporte dos IE do provedor para os laboratórios. O lote contendo *E. coli* foi considerado suficientemente estável às duas temperaturas supracitadas, enquanto que o lote contendo *Salmonella* spp. foi estável apenas a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$, tendo decréscimo na concentração do micro-organismo a $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Concluiu-se que todos os lotes produzidos foram suficientemente homogêneos, contudo só foram estáveis nas condições estudadas aqueles produzidos com uma única bactéria. Porém, é necessário que haja controle de temperatura no transporte dos lotes aos laboratórios a fim de evitar a redução da concentração celular, impossibilitando seu uso. É necessário investigar a interação de duas bactérias em uma mesma matriz para que no futuro possam ser produzidos lotes mistos de micro-organismos suficientemente estáveis. Esse é o primeiro trabalho a descrever a metodologia e produção de itens de ensaio contendo um ou mais micro-organismos em matriz frango.

Palavras-chave: Itens de Ensaio. Controle de Qualidade. Carne de Frango.

ABSTRACT

Foodborne illness is known as a major cause of morbidity and mortality worldwide. In many countries, over the last two decades, it has emerged as a growing economic and public health problem. Estimates forecast that the problem will increase in the 21st century due to numerous global changes like: population growth, poverty and food exports; which influence food security at international level. Laboratories of microbiological food analysis play an important role in the control of hygienic-sanitary quality. Therefore, there is a necessity to prove the analytical quality in order to avoid incorrect results, especially in the public laboratories that analyze food illness outbreaks samples. Thus, the participation in proficiency tests (PT), recommended by ABNT ISO 17025 - International standard of competence for test laboratories, is a quality tool used to evaluate the reliability of the results being produced and to supplement the internal quality control procedures. In Brazil, National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is one of the few providers that develops and coordinates proficiency tests. For that reason, the objective of this work was to produce batches of test items (TI) for usage in quantitative PT- one batch containing *Escherichia coli* and one containing *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* concomitantly - and qualitative, batch containing *Salmonella* spp. All batches were produced in cooked shredded chicken matrix. Since this food had not been used for TI production previously, it was necessary to produce pilot batches to evaluate the viability of its use in microbiology PT area. Therefore, three pilot batches were produced and, subsequently, three official batches using the same methodology. The matrix was distributed in vials for lyophilization, contaminated with the target bacteria in specific concentrations and subjected to lyophilization, as a preservation technique. During the preparation, cryoprotectants sucrose and trehalose were used, aiming at a greater stability of the test items against the stress processes for the microorganisms, just as freezing and lyophilization. All lots were considered homogeneous and stable at $\leq (-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ and $\leq -70 ^\circ\text{C}$ throughout the studied period. The only exception was the final batch containing *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, which had a prominent fall in the amount of *Bacillus cereus* at 49 days of storage, making the batch unfeasible. A stability study was carried out at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ and $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$ for 4 days in the other two official batches that were successful in the stability study at $\leq (-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ and $\leq -70 ^\circ\text{C}$ in order to simulate temperatures of exposure at the transport process of the TI of the supplier to laboratories. The batch containing *Escherichia coli* was stable at both temperatures above, whereas the batch containing *Salmonella* spp. was stable only at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$, with a decrease in microorganism

concentration at (35 ± 2) °C. It is concluded that the batches with only one microorganism were homogeneous and stable, presenting the necessary requirements to be used in PT. However, is necessary to control transport temperature in the batches sent to the laboratories in order to avoid the reduction of cellular concentration, which may compromise its use. It is necessary to investigate the interaction of two bacteria in the same matrix so that in future mixed batches of sufficiently stable microorganisms can be produced. Thereby, this is the first work to describe the methodology and production of test items containing one or more microorganisms in the chicken matrix.

Key words: test items, quality control, chicken meat.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Frasco contendo 5 g de frango desfiado cozido liofilizado	23
Figura 2 - Demonstração da verificação de vácuo por emissão de centelha elétrica em frasco contendo leite liofilizado.....	27
Gráfico 1 - Estabilidade do lote piloto SALM 08/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$	34
Gráfico 2 - Estabilidade do lote final SALM 09/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$	35
Gráfico 3 - Estabilidade do lote piloto EC 14/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$ pelo método de contagem em placas (UFC/g) e número mais provável (NMP/g).....	35
Gráfico 4 - Estabilidade do lote final EC 16/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$ pelo método de contagem em placas (UFC/g) e número mais provável (NMP/g).....	36
Gráfico 5 - Estabilidade do lote piloto BCSTA 04/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$	36
Gráfico 6 - Estabilidade do lote final BCSTA 05/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4) ^\circ\text{C}$ e $\leq -70 ^\circ\text{C}$	37
Gráfico 7 - Estabilidade do lote final EC 16/17 nas temperaturas $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$	38
Gráfico 8 - Estabilidade do lote final SALM 09/17 nas temperaturas $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados sobre preparação das cepas bacterianas para produção dos lotes de itens de ensaio.....	25
Tabela 2 - Concentração dos micro-organismos (UFC/g) nos lotes antes e após o processo de liofilização.....	30
Tabela 3 - Valores gerados em \log_{10} UFC/g e \log_{10} NMP/g no teste de homogeneidade dos lotes produzidos.....	31
Tabela 4 - Resultados do estudo de estabilidade na temperatura de $(-20^{\circ}\text{C} \pm 4)$ °C e $\leq -70^{\circ}\text{C}$ dos lotes produzidos.....	33
Tabela 5 - Resultados do estudo de estabilidade de curta duração dos lotes EC 16/17 e SALM 09/17.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

Anova - Análise de Variância

APC - Ágar padrão para contagem

BHI - Caldo infusão cérebro-coração

c - valor crítico da homogeneidade

CBRVS - Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

ECP - Estafilococos coagulase positiva

EP - Ensaio de proficiência

IE - Item de ensaio

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LST – Lauril Triptose

MR - Material de Referência

MYP - Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina, do inglês *Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar*

NMP - Número Mais Provável

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RPM - Rotação por minuto

S²am - Valor da variância entre as amostras

SSP - Solução Salina Peptonada

UFC - Unidade Formadora de Colônia

VRBA - Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose, do inglês *Violet Red Bile Agar*

VRBG - Ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose, do inglês *Violet Red Bile Glucose Agar*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças transmitidas por alimentos	12
1.1.1 Carne de frango	13
1.1.2 <i>Salmonella</i> spp.	14
1.1.3 Estafilococos coagulase positiva.....	15
1.1.4 Coliformes termotolerantes	16
1.1.5 <i>Bacillus cereus</i>	17
1.2 Ferramentas de qualidade	18
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 Materiais e Métodos	22
4.1 Seleção das cepas bacterianas	22
4.2 Desenvolvimento das metodologias de produção de itens de ensaio	22
4.3 Preparo da matriz	22
4.4 Preparação das cepas bacterianas	23
4.5 Preparo e liofilização dos IE	26
4.5.1 Preparo das suspensões bacterianas	26
4.5.2 Contagem das suspensões bacterianas	26
4.5.3 Liofilização dos IE	27
4.5.4 Inspeção visual, verificação de vácuo, rotulagem e armazenamento.....	27
4.6 Teste de homogeneidade	28
4.7 Estudo de estabilidade	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Controle da concentração celular durante o preparo dos IE	30
5.2 Estudos de homogeneidade	31
5.3 Estudos de estabilidade	32
5.3.1 Estudo de Estabilidade de Longa Duração.....	32
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças transmitidas por alimentos

Surtos graves de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido documentados em todos os continentes na última década. As DTAs não afetam apenas a saúde e o bem-estar da população, mas também geram consequências financeiras negativas para os indivíduos, comunidades, empresas e países, que reduzem significativamente a produtividade econômica e ameaçam os meios de subsistência. A globalização do comércio de alimentos oferece muitos benefícios aos consumidores, pois traz ao mercado uma maior variedade de alimentos acessíveis e que atendem às demandas da população. A diversidade de alimentos em uma dieta balanceada melhora o estado nutricional e a saúde. Ao mesmo tempo, essas mudanças apresentam novos desafios à segurança de alimentos e têm repercussões generalizadas para a saúde, por exemplo, criando um ambiente no qual tanto doenças conhecidas como novas DTAs podem ocorrer em maior magnitude. A segurança de alimentos é um componente crítico para o desenvolvimento sustentável. Alimentos seguros contribuem para menos doenças, aumentam a produtividade e contribuem para o aumento da exportação e aumento de renda, quando em conformidade com os padrões internacionais de segurança de alimentos (WHO, 2013).

Vários são os fatores que contribuem para a emergência das DTAs, entre os quais destacam-se: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações. Acrescentam-se outros determinantes para o aumento na incidência das DTA, tais como a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo – *fast-foods* –, o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive a nível internacional (BRASIL, 2010).

As DTAs representam um entrave significativo ao desenvolvimento socioeconômico em todo o mundo, e nem sempre há dados que permitam conhecer e identificar as causas dessas doenças. Apesar das lacunas de dados e limitações, evidencia-se que a ocorrência global de DTA é alta e afeta indivíduos de todas as idades, mas especialmente crianças

menores de cinco anos de idade e pessoas que vivem em sub-regiões de baixa renda do mundo, como a África e o sudeste Asiático, que são os locais que mais sofrem com o problema. Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas, o número de mortes ao ano por DTA, em todo o mundo, é de 420 mil, sendo 320 mil nas duas regiões supracitadas. Na América, por exemplo, são 9 mil mortes e a estimativa é de que 600 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente (WHO, 2015).

A maioria das infecções transmitidas por alimentos são causadas pelo manuseio inadequado. A manipulação de alimentos, a refrigeração e a cocção adequada podem prevenir DTA em humanos. Também deve-se ter cuidado com a contaminação cruzada, por exemplo, nos utensílios utilizados na cozinha e na manipulação da carne crua, para evitar que alimentos que venham a ser servidos sem nenhum outro tipo de tratamento térmico ou higienização tenham contato com o conteúdo intestinal ou outras regiões da carne (USDA, 2018).

Muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, fazendo com que o acometido não procure auxílio médico e tampouco notifique o caso. Os sintomas mais comuns das DTAs incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e febre. Todavia, dependendo do agente etiológico envolvido, o quadro clínico pode ser extremamente sério, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (FERRAZ et al., 2015).

A distribuição global de alimentos aumenta a possibilidade de que alimentos contaminados produzidos em um país possam representar um risco em outras partes do mundo. O estabelecimento de padrões globais de segurança de alimentos ajuda a proteger as pessoas em todos os lugares dos riscos de DTA (WHO, 2013). No Brasil, *Salmonella* spp. é o principal agente etiológico identificado em surtos de DTA com 34,1% dos casos, seguido de *Escherichia coli* (26,9%), *Staphylococcus aureus* (17,5%), coliformes (6,5%), *Bacillus cereus* (5,8%), entre outros (BRASIL, 2018).

1.1.1 Carne de frango

O Brasil está no 2º lugar mundial de produção de cortes de frango, com 12,9 milhões de toneladas sendo produzidas, com consumo de 41,1 kg de carne per capita, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2017).

As práticas alimentares podem ser definidas como o hábito e o modo dos indivíduos consumirem alimentos, influenciados, sobretudo, pela cultura e pelas condições de vida. Ao se tornarem habituais, essas práticas resultam em comportamentos que tanto podem contribuir

para manter a saúde e o bem-estar como para desencadear problemas de saúde (COSTA, BRITO, LESSA, 2014). Atualmente a carne de frango vem sendo muito utilizada na alimentação, pois é classificada como alimento saudável com baixo teor de gordura e colesterol desde que seja consumida sem pele, sendo assim indicada para consumo em todas as idades e por indivíduos que tenham riscos cardiovasculares. Geralmente, os consumidores estão pouco preocupados com a qualidade nutricional e sanitária do alimento, sendo a aparência e o preço os fatores que mais determinam na hora da compra (SALES *et al.*, 2014).

Diversos estudos demonstram presença de micro-organismos potencialmente patogênicos na carne de frango ao redor do mundo (CARDOSO *et al.*, 2015; THANIGAIVEL; ANANDHAN, 2015; VAIDYA; GHUGARE; KUTTY, 2016; HUANG *et al.*, 2016; MONTEZANI *et al.*, 2017; RISTORI *et al.*, 2017; FOX *et al.*, 2017; UDDIN *et al.*, 2018; HUTCHINSON; WHEELER; MOHLE-BOETANI, 2018). Relatos dos Estados Unidos demonstram que mais de um milhão de pessoas ficam doentes por ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. a cada ano, e em aproximadamente 20% desses casos, a carne de frango é o veículo desse patógeno (HOFFMANN *et al.*, 2015). Essa carne normalmente é consumida após tratamento térmico e os riscos de infecção são, portanto, reduzidos. Entretanto, durante a preparação de alimentos naturalmente contaminados, os agentes patogênicos em potencial são distribuídos com frequência nas superfícies de contato com as mãos e alimentos, o que favorece a ocorrência de contaminação cruzada, inclusive em preparações domésticas (COGAN; BLOOMFIELD; HUMPHREY, 1999; GORMAN; BLOOMFIELD; ADLEY, 2002; PARDI *et al.*, 2006; COOK; ODUMERU; LEE; POLLARI, 2012).

1.1.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence a família Enterobacteriaceae e inclui bactérias gram-negativas, flageladas, não-esporulantes e facultativas que crescem bem entre 35 e 37 °C. Este micro-organismo tem a capacidade de induzir gastroenterite localizada em humanos e alguns animais, mas a gama de infecções no hospedeiro varia dependendo dos fatores de virulência bacteriana e da imunidade e capacidade resistente do hospedeiro. Os sinais e sintomas podem evoluir de náuseas, vômitos e diarreia a septicemia ou bacteremia, e artrite reativa como sequela pós-infecção (RICKE *et al.*, 2013).

Salmonella é o principal agente etiológico identificado em surtos de DTA no Brasil de 2000 a 2017 (BRASIL, 2018) e é frequentemente presente em frango, sendo essa a maior

fonte de salmonelose (UDDIN *et al.*, 2018). A contaminação pode ocorrer em várias etapas do processo de abate da ave, como depenagem, evisceração e corte, enquanto que o resfriamento em banho-maria aumenta a contaminação cruzada (NORTHCUTT *et al.*, 2003). Como esse micro-organismo coloniza o trato gastrointestinal, é excretado nas fezes, de onde podem ser transmitidos por insetos ou outros animais para um grande número de locais. Também é encontrado em água contaminada por fezes, geralmente. Humanos e animais que consomem essa água poluída podem excretar a *Salmonella* spp. através de matéria fecal, continuando o ciclo de contaminação (MANOJ; SINGH; SINGH, 2015).

A presença de *Salmonella* spp. como contaminante biológico em alimentos é amplamente relatada em diversas partes do mundo (THANIGAIVEL; ANANDHAN, 2015; TAYLOR *et al.*, 2015; CARDOSO *et al.*, 2015; USDA-FIS, 2016; VAIDYA; GHUGARE; KUTTY, 2016; EJO *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; MONTEZANI *et al.*, 2017; RISTORI *et al.*, 2017; HUTCHINSON; WHEELER; MOHLE-BOETANI, 2018).

1.1.3 Estafilococos coagulase positiva

Staphylococcus aureus é um importante patógeno devido a sua combinação de virulência mediada por toxina, invasividade e resistência a antimicrobianos. Este micro-organismo não forma esporos mas pode causar contaminação em alimentos durante a preparação e processamento. *S. aureus* pode crescer em uma ampla gama de temperaturas (7 °C-48,5 °C; crescimento ótimo de 30 a 37 °C), pH (4,2 a 9,3; crescimento ótimo de 7 a 7,5) e concentrações de sais acima de 15%. É tolerante a dessecação com habilidade de sobreviver a ambientes secos e estressantes, como cavidade nasal ou pele humana e superfícies inanimadas, como roupas e superfícies. Uma típica DTA causada por *S. aureus* tem um início rápido após a ingestão do alimento contaminado (geralmente 3-5 h), devido à produção de uma ou mais toxinas pelas bactérias durante o seu crescimento a temperaturas permissivas (LOIR, BARON, GAUTIER, 2003). Entretanto, o período de incubação depende da quantidade de toxina ingerida. As enterotoxinas são altamente estáveis e resistentes a altas temperaturas e condições estressantes, como congelamento e dessecação. Além disso, também são resistentes a enzimas proteolíticas, como pepsina e tripsina e baixo pH, permitindo sua funcionalidade no trato gastrointestinal após a ingestão do alimento. Os sintomas incluem hipersalivação, náusea, vômito, dores abdominais com ou sem diarreia. Apesar de ser auto-limitada e dos sintomas desaparecerem entre 24-48 h após o início, pode

ser severa, especialmente em crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

S. aureus pode contaminar o alimento a partir da pele e das vias respiratórias de manipuladores de alimentos doentes ou assintomáticos e através de manuseio de alimento contaminado e outros itens de cozinha que podem sofrer contaminação cruzada durante a manipulação (PARDI *et al.*, 2006; BORTOLAIA; ESPINOSA-GONGORA; GUARDABASSI, 2016). Após a contaminação, deficiências das condições de armazenamento ou conservação propiciam a proliferação de *S. aureus* e consequente contaminação dos produtos com as enterotoxinas que são produzidas por estas bactérias, sendo a educação sanitária dos manipuladores uma ferramenta fundamental para assegurar a qualidade dos alimentos e a saúde do consumidor (MONTEZANI *et al.*, 2017).

Os alimentos relacionados com contaminação com *S. aureus* são: carnes e produtos cárneos, carnes de aves e produtos de ovos, leite, produtos lácteos, saladas, produtos de padaria, especialmente doces e bolos recheados com cremes. Sua ocorrência é relatada a nível global (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014; VAIDYA; GHUGARE; KUTTY, 2016; SALEH; EL-MOHSEN; IBRAHIM, 2016; THANIGAIVEL; ANANDHAN, 2015; MONTEZANI *et al.*, 2017; FOX *et al.*, 2017) e no Brasil corresponde ao terceiro agente etiológico mais frequentemente encontrado na investigação de DTA, correspondendo ao micro-organismo responsável por pouco mais de 15% dos surtos (BRASIL, 2018).

1.1.4 Coliformes termotolerantes

Coliformes são um grande grupo de micro-organismos gram-negativos, oxidase-negativos, não esporulados, com formato de bastonete que pertencem a família Enterobacteriaceae. Este grupo refere-se às bactérias que são de crescimento aeróbico e anaeróbico facultativo, além de fermentar a lactose a 37 °C em 48 h e possuírem a enzima beta-galactosidase (ENVIRONMENTAL AGENCY, 2002). Essa definição baseada em enzimas caracterizam tanto as bactérias do intestino quanto aquelas que são consideradas ambientais, como por exemplo, bactérias dos gêneros *Pantoeae* spp., *Kluyvera* spp. e *Cedecea* spp (STEVENS; ASHBOLT; CUNLIFFE, 2003). Elas podem ser isoladas de águas poluídas e não poluídas, solos e plantas, bem como a partir das fezes de seres humanos e animais de sangue quente (mamíferos e aves). Assim, o grupo coliforme representa não apenas bactérias intestinais (de origem fecal), mas também outras formas de vida livre (origem não-fecal) (VON SPERLING, 2007).

Coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes. A característica que o distingue dos coliformes é serem resistentes a temperaturas mais elevadas e, portanto, ter habilidade de crescer e fermentar lactose até 44 °C. Os coliformes termotolerantes frequentemente são chamados de coliformes fecais, pois condições de temperaturas mais elevadas deveriam suprimir as bactérias de vida livre, ambientais. Entretanto, essas bactérias de origem não-fecal podem estar presentes sob essas circunstâncias (VON SPERLING, 2007). Então, o termo mais apropriado é coliformes termotolerantes. Dado que este grupo engloba coliformes que podem estar presentes tanto no ambiente como nas fezes, como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Citrobacter* spp., (STEVENS *et al.*, 2003; VON SPERLING, 2007), os testes microbiológicos para estas bactérias não garantem a relação com verdadeira contaminação fecal (PARUCH; MÆHLUM, 2012).

E. coli comumente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Sendo um micro-organismo intestinal, pode ser defecada, e, portanto, é principalmente transmitida ao ambiente via fecal. Essa bactéria é a principal do grupo dos coliformes termotolerantes, sendo presente em grande número nas fezes, em concentrações de 10⁹ por grama de matéria fecal (EDBERG *et al.*, 2000). Como parte normal da microbiota, muitas cepas de *E. coli* permanecem inofensivas. Entretanto, existem cepas patogênicas associadas a doenças em animais e humanos (PARUCH, MÆHLUM, 2012).

Houve casos relatados em oito países da Europa e na América do Norte, levando a 53 mortes. Este surto na Alemanha causou perda econômica de US \$ 1,3 bilhão para agricultores e indústrias e custou US \$ 236 milhões em ajuda emergencial a 22 Estados-Membros da União Europeia (YENI *et al.*, 2015). No Brasil, *E. coli* representa o segundo agente etiológico mais identificado em surtos de DTA (BRASIL, 2018).

1.1.5 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa, produtora de toxinas. É comumente encontrada no ambiente, como vegetação e solo. Também pode estar presente nos alimentos e se proliferar rapidamente a temperatura ambiente (MCDOWELL, FRIEDMAN, 2017). Este micro-organismo forma esporos, o que facilita a sua sobrevivência por longos períodos de tempo em alimentos secos, mesmo após tratamento térmico, devido a sua resistência, culminando em sua prevalência no alimento e ingestão pelos indivíduos (GOEPFERT *et al.*, 1972; KRAMER; GILBERT, 1989).

Existem dois principais tipos de doenças intestinais causadas por *B. cereus*: uma é caracterizada por diarreia, já a outra por náuseas e vômitos. *B. cereus* também está envolvido com infecções nos olhos, trato respiratório e feridas. Sua patogenicidade está intimamente associada à produção de enzimas. No trato gastrointestinal, as células vegetativas, ingeridas como células viáveis ou esporos, produzem e secretam enterotoxina que induz a síndrome diarreica, enquanto que a enterotoxina emética é produzida nos alimentos e ingerida como toxina formada. A enfermidade causada por esse micro-organismo é relacionada a vários alimentos, como carne bovina, peru, arroz, feijão, vegetais e pode ocorrer por ingestão dos alimentos contaminados com *B. cereus* enterotoxigênico ou pelas suas toxinas (MCDOWELL; FRIEDMAN, 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, *B. cereus* é o quinto agente etiológico mais frequentemente identificado em surtos de DTAs (BRASIL, 2018).

1.2 Ferramentas de qualidade

Alimentos seguros beneficiam a saúde individual e da população, além de favorecer o crescimento econômico da região onde a segurança de alimentos é praticada e aprimorada. Centenas de milhares de pessoas morrem a cada ano porque consomem alimentos contaminados (FUNG; WANG; MENON, 2018). Laboratórios de controle de qualidade de alimentos são exigidos quanto à utilização de métodos validados sempre que possível. Por essa razão, métodos analíticos devem ser submetidos a estudos de validação internos e externos (KOCH *et al.*, 2011).

Um dos sistemas de garantia da qualidade utilizados em laboratórios de ensaio é a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, que descreve os “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017). Uma abordagem descrita como um dos requisitos dessa norma é a participação em ensaios de proficiência (EP). A acreditação segundo a norma permite vantagens ao laboratório acreditado, como: conquista de novos mercados, diferenciação competitiva, aumento da confiança dos clientes nos resultados das calibrações/ensaios; entre outras. O EP é um sistema para avaliar objetivamente o desempenho de um laboratório pelo uso de meios externos e inclui comparação regular dos resultados de um laboratório com os de outros laboratórios. Isto é conseguido pelo provedor do programa de EP distribuindo itens de ensaio (IE) homogêneos e estáveis para os participantes para análise e relato dos resultados. Cada distribuição de IE é referida como uma

"rodada". O objetivo principal do EP é ajudar o participante a avaliar a precisão de suas medições. O EP desempenha um papel valioso, uma vez que fornece uma prova objetiva da competência do participante. Essa evidência pode ser usada para melhorar o desempenho do participante e/ou confiança na capacidade do participante de realizar o ensaio específico (EURACHEM GUIDE, 2011; INMETRO, 2012; CIPROTTI *et al.*, 2013).

No Brasil, existem poucos provedores de EP na área de alimentos, o que dificulta a participação dos laboratórios atuantes nesta área. O desenvolvimento de programas de EP brasileiros diminuiu a dependência de provedores internacionais, que cobram valores elevados pelos mesmos. Além disso, fornece aos laboratórios participantes comprovações da confiabilidade dos resultados dos seus ensaios, permitindo oportunidades de melhorias. Os ensaios oferecidos por provedores de EP em microbiologia de alimentos no Brasil são baseados nos micro-organismos citados na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 01/01/2001 – Anvisa/MS (BRASIL, 2001) que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, que encontra-se em revisão e sua consulta pública foi concluída em 2018 (BRASIL, 2019a,b).

Em 2002, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) iniciou o Programa de Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária (EP/INCQS), ofertando esse serviço a todos os laboratórios interessados.

2 JUSTIFICATIVA

Os laboratórios que realizam o controle microbiológico de alimentos possuem papel significativo na segurança dos alimentos e consequente prevenção de doenças. A participação em ensaios de proficiência permite aos laboratórios a comprovação da obtenção de resultados confiáveis em suas análises e monitoramento do desempenho. Tendo em vista que o INCQS é agente fundamental no cenário da qualidade de alimentos por ser provedor de EP, é necessária a constante ampliação da produção de IE em diferentes matrizes com micro-organismos diversos para que se aproxime cada vez mais da realidade de análise dos laboratórios. Como a carne de frango é amplamente consumida e possui grande interesse econômico no Brasil, é necessário que os laboratórios de ensaio que realizam análises de controle microbiológico em alimentos produzam resultados confiáveis da presença de patógenos nesse alimento. Esse é o primeiro trabalho a descrever a metodologia e produção de itens de ensaio contendo um ou mais micro-organismos em matriz frango. Isso permite a implementação de ações preventivas e corretivas para a melhora dos procedimentos, o que é primordial para os laboratórios pertencentes ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, pois estes realizam análises de surtos de DTA, as quais culminam em ações de políticas públicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir lotes de IE quantitativo para utilização em EP contendo coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva com *B. cereus* concomitantemente e qualitativo contendo *Salmonella* sp. em matriz frango.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar as cepas que serão utilizadas na produção dos IE;
- Produzir lotes pilotos para avaliar a viabilidade das cepas e da técnica de produção na matriz frango;
- Desenvolver e produzir lotes finais de IE para ensaios qualitativo, para *Salmonella* sp., e quantitativos para coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva com *B. cereus* em matriz frango;
- Analisar a viabilidade dos lotes através de testes de homogeneidade e estabilidades de curta e longa duração.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das cepas bacterianas

A escolha dos micro-organismos seguiu os critérios da legislação brasileira vigente, a RDC nº12 de 2001, segundo o item para pratos prontos para o consumo a base de carne de frango. As cepas de *Escherichia coli* (P4328), *Salmonella* Enteritidis (P3440), *Bacillus cereus* (P3441) e *Staphylococcus aureus* (P4283) foram isoladas dos seguintes alimentos: alface *in natura*, coxa de frango congelada, farinha de mandioca e queijo tipo ricota, respectivamente. Previamente, o Setor de Alimentos realizou a confirmação da identidade das cepas por técnicas fenotípicas e moleculares. As cepas se encontram depositadas na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS/FIOCRUZ.

4.2 Desenvolvimento das metodologias de produção de itens de ensaio

Foram produzidos três lotes pilotos denominados EC 14/17, SALM 08/17 e BCSTA 04/17 contendo *E. coli*; *Salmonella* Enteritidis; *Bacillus cereus* e *S. aureus* respectivamente, contendo 50 frascos cada. Posteriormente, foram produzidos outros três lotes finais denominados EC 16/17, SALM 09/17 e BCSTA 05/17, contendo 150 frascos cada. Os mesmos procedimentos foram usados para todos os lotes. O desenvolvimento da metodologia para a produção dos IE teve como base as metodologias descritas por In't Veld e colaboradores (1998), Morgan e colaboradores (2006) e Brandão e colaboradores (2014b). Os procedimentos de preparo dos IE e as análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

4.3 Preparo da matriz

O frango utilizado como matriz foi obtido de um supermercado do município Rio de Janeiro, na forma de filés de frango congelados de uma mesma marca. Posteriormente, foi cozido e desfiado em panela de pressão com água por 20 min. Em seguida, foram aliquoteados 5 g de frango em frascos de vidro com rolha de borracha. A fim de eliminar a contaminação intrínseca, os frascos contendo a matriz foram submetidos a um ciclo de esterilização de 121°C/15 min.

Após a esterilização, os frascos foram submetidos a um ciclo de liofilização antes da etapa de contaminação da matriz. Foi utilizado o liofilizador IMALIFE (China) com ciclo contendo etapa de congelamento a -40°C e vácuo até $200\ \mu\text{bar}$. A boa aparência de um frasco após a liofilização está apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Frasco contendo 5 g de frango desfiado cozido liofilizado.



Fonte: (Do autor, 2017).

4.4 Preparação das cepas bacterianas

Todas as cepas foram cultivadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, ALEMANHA) a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 24 h. *E. coli* e *S. Enteritidis* foram, em seguida, cultivadas em Caldo Luria Bertani (LB) com 2,4% de NaCl (Difco, EUA) a $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 28 h. Posteriormente, oito mililitros de cada cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min (Eppendorf, EUA) em microtubos estéreis com capacidade de 2 mL cada. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado ressuspendido em solução salina peptonada (SSP) a 0,1%. Em seguida, foram homogeneizados em aparelho agitador de tubos. Para as culturas de *S. Enteritidis* e *E. coli*, foram descartados os sobrenadantes e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de SSP a 0,1% (Merck, ALEMANHA) com 100 mM de trealose. Já para as culturas de *B. cereus* e *S. aureus*, foi utilizado o crioprotetor sacarose (100 mM). A concentração foi ajustada em fotocolorímetro (Libra S2, biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm a partir de transmitâncias conhecidas equivalentes à quantidade de células por mL. Diluições foram realizadas em SSP a 0,1% para alcançar a concentração alvo em cada lote (Tabela 1). Para as culturas de *S. Enteritidis* e *E. coli*, a suspensão bacteriana foi mantida durante aproximadamente 30 minutos a temperatura de 2 a 8°C . A preparação do lote final de *E. coli* com uma concentração superior ao do piloto ocorreu a fim de que pudesse ser utilizada

a metodologia de contagem em placas, que é recomendada para alimentos que se espera uma carga microbiana $> 10^2/g$. Como o decaimento do número de bactérias ao longo da produção e armazenamento é esperado, calculou-se uma maior concentração de *E. coli* durante a preparação para o lote final.

Tabela 1 - Dados sobre preparação das cepas bacterianas para produção dos lotes de itens de ensaio.

Micro-organismo	N.º da CBRVS	1º Cultivo/ condição	2º Cultivo/condição	Solução crioprotetora	Ajuste da concentração celular	Concentração final desejada (UFC/g)
<i>E. coli</i>	P4328		LB com 2,4% NaCl/(35 ± 2) °C			Piloto: 1,0x10 ² Final: 5,0x10 ³
<i>S. Enteritidis</i>	P3440	BHI /(35 ± 2) °C - 24 h	- 28 h	SSP 0,1% com 100 mM de trealose	2% (2 x 10 ⁹ /mL)	5,0 x 10 ³
<i>S. aureus</i>	P4283		-	SSP a 0,1% com 100 mM		5,0 x 10 ³
<i>B. cereus</i>	P3441			de sacarose	6% (equivalente a 2 x 10 ⁶ /mL)	1,0 x 10 ⁴

CBRVS: Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária. UFC: Unidade Formadora de Colônia, BHI: Caldo infusão cérebro-coração, LB: Caldo Luria Bertani, SSP: Solução Salina Peptonada.
Fonte: (Do autor, 2019).

4.5 Preparo e liofilização dos IE

4.5.1 Preparo das suspensões bacterianas

Foi feita uma diluição 1:100 da solução com micro-organismos em SSP a 0,1% contendo crioprotetor. Esta solução foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (CORNING, EUA), com uso de um magneto estéril, durante 30 minutos e mantida em banho de gelo, sendo que este último possuía a função de manter a temperatura da solução em torno de 4 °C, de forma que os micro-organismos não proliferassem, não alterando a concentração alvo desejada antes da liofilização. Ainda em agitação, volumes de 0,5 mL da suspensão foram dispensados nos frascos contendo 5g de frango pré-lioofilizado, com uso de uma bomba peristáltica (WATSON-MARLOW, Inglaterra).

4.5.2 Contagem das suspensões bacterianas

A partir da solução utilizada para contaminação dos frascos, foram preparadas diluições decimais em SSP a 0,1%, e 1 mL e 0,1 mL foram semeados, pela técnica *pour-plate*, em duplicata, em ágar padrão para contagem (APC) (MERCK, Alemanha) para contagem de *E. coli* e *S. Enteritidis*, respectivamente. As placas foram incubadas a (35 ± 2) °C por 48 h. Já para os demais micro-organismos, foram preparadas diluições decimais em SSP a 0,1% e 0,1 mL foi semeado, pela técnica *spread-plate*, em duplicata, em ágar Baird Parker (DIFCO, França) e ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP, DIFCO, França) para contagem de *S. aureus* e *B. cereus*, respectivamente. As placas de ágar Baird Parker foram incubadas a (35 ± 2) °C por 48 h, enquanto que as placas de ágar MYP foram incubadas a (30 ± 2) °C por 24 h. Foi realizada a contagem das colônias nas placas, levando em conta o limite de precisão da técnica de 15 a 150 colônias para *B. cereus*, 20 a 200 colônias para *S. aureus* e 25 a 250 colônicas para *E. coli* em contador de colônias (Phoenix Lufenco, Brasil). Essa quantificação foi realizada após a homogeneização da solução, antes da contaminação dos frascos, com o objetivo de verificar se a concentração de células presente na solução estava na concentração alvo desejada antes da liofilização.

4.5.3 Liofilização dos IE

Após a contaminação, rolhas de borracha estéreis próprias para a liofilização (WEST PHARMACEUTICAL, Brasil) foram posicionadas nos frascos, de modo que os orifícios laterais das rolhas ficassem expostos. Os frascos foram congelados em freezer a ≤ -70 °C (THERMO, EUA) e submetidos novamente a um ciclo de liofilização por 26 h a uma temperatura aproximada de -40 °C e pressão inferior a 200 μ bar em aparelho liofilizador (IMALIFE, China).

4.5.4 Inspeção visual, verificação de vácuo, rotulagem e armazenamento

Após a retirada dos frascos fechados do liofilizador foi realizada uma inspeção visual com o objetivo de avaliar o aspecto das amostras liofilizadas, de forma a reprovar amostras liquefeitas ou caramelizadas. As amostras em perfeitas condições após a inspeção visual foram testadas quanto à presença de vácuo em cada frasco, utilizando aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, 2-12-8, Brasil).

A bobina utilizada emite uma centelha elétrica que faz com que os gases remanescentes no interior do frasco se ionizem, gerando uma coloração lilás, indicando que o frasco está sob condição de vácuo (Figura 2). A presença de vácuo nas amostras é um indicador da qualidade da liofilização, além de proporcionar uma maior estabilidade aos IE produzidos. Os frascos que apresentaram vácuo foram lacrados com tampas de metal, etiquetados e estocados a ≤ -70 °C e (-20 ± 4) °C. Os frascos que não apresentaram vácuo foram descartados.

Figura 2 - Demonstração da verificação de vácuo por emissão de centelha elétrica em frasco contendo leite liofilizado.



Fonte: (Do autor, 2017).

4.6 Teste de homogeneidade

Foi realizada a quantificação de 10 unidades de cada lote piloto e 16 unidades de cada lote final, selecionados aleatoriamente, usando como ferramenta para essa seleção a “amostragem” do programa do Microsoft Office Excel® 2010. Os frascos foram retirados do freezer a ≤ -70 °C e mantidos a temperatura ambiente durante 30 minutos antes da análise. A matriz foi reconstituída com 20 mL de SSP a 0,1%. Após 15 minutos, a matriz foi transferida para um saco plástico estéril Whirl-Pak® Filter Bag (Nasco, EUA) e foi adicionado mais 25 mL de SSP a 0,1%. Em seguida, foi homogeneizada em aparelho Stomacher (Seward Fisher Scientific, CANADÁ), em nível de velocidade “normal” durante 60 segundos, perfazendo a diluição 10^{-1} . A partir da diluição 10^{-1} foram preparadas diluições decimais seriadas.

Para os estudos da homogeneidade para contagem de *E. coli* foi empregada a metodologia de semeadura em profundidade em 10 mL de ágar APC. Após 4 horas de incubação a (35 ± 2) °C, adicionou-se 10 mL de uma sobrecamada de Ágar Vermelho Violeta Bile Lactose (VRBA, Difco, França) (BRANDÃO *et al.*, 2014b). Além disso, foi realizada a técnica do Número Mais Provável (NMP) (FENG *et al.*, 2002). A partir de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} , 1 mL de cada diluição foi inoculado, em triplicata, em tubos contendo 10 mL de caldo lauril triptose (LST) por 24h a (35 ± 2) °C. Os tubos que não apresentaram turvação e produção de gás foram reincubados por mais 24h. Em seguida, a leitura foi realizada com base na tabela do NMP (BLODGETT, 2010). Para contagem de *S. Enteritidis* foi realizada semeadura em profundidade em 10 mL de APC. Após 4 h de incubação a (35 ± 2) °C, adicionou-se 10 mL de ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose (VRBG, Difco, França) (BRANDÃO *et al.*, 2014b). Já a contagem de *S. aureus* e *B. cereus*, foi realizada pela técnica de *spread-plate* em ágar Baird Parker (BENNETT; LANCETTE, 2001) e ágar MYP (TALLENT *et al.*, 2012) respectivamente. As placas referentes a *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. aureus* foram incubadas a (35 ± 2) °C por 48h, enquanto que as placas referentes a *B. cereus* foram incubadas a (30 ± 2) °C por 24 h. Foi realizada a contagem das colônias nas placas, levando em conta o limite de precisão das técnicas supracitado (item 4.4).

A avaliação estatística da homogeneidade foi realizada de acordo com o protocolo harmonizado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), atribuindo-se o valor do desvio-padrão alvo (σ_p) para a concentração celular, do mesmo modo adotado em outras rodadas de EP (INCQS, 2012a; INCQS, 2012b; INCQS, 2012c;) de $0,25 \log_{10}$. A partir dos resultados obtidos, foi comparado o valor da variância entre as amostras (S^2_{am}) com o valor crítico da homogeneidade (c). Se $S^2_{am} < c$, o lote é considerado suficientemente homogêneo.

4.7 Estudo de estabilidade

Foram realizados estudos de estabilidade em longa duração nas temperaturas de armazenamento e de referência nos lotes pilotos e finais; e de estabilidade em curta duração nos lotes finais que foram considerados suficientemente estáveis nas temperaturas de armazenamento e referência. Este último estudo mimetiza as temperaturas que os IE poderão ser expostos durante o envio aos laboratórios participantes do EP. Os estudos de longa duração foram realizados na temperatura de referência ≤ -70 °C e na temperatura de armazenamento (-20 ± 4) °C. A estabilidade em longa duração a ≤ -70 °C ocorreu até 22 dias para os lotes piloto e no mínimo 35 dias para os lotes finais. Já a estabilidade a (-20 ± 4) °C ocorreu até no mínimo 22 dias para os lotes piloto e no mínimo 49 dias para os lotes finais. Os frascos foram quantificados através da metodologia descrita no teste da homogeneidade (item 4.6).

Para a condução do teste de estabilidade em curta duração foi utilizada a metodologia do “*Isochronous Design*” ou modelo isócrono (LAMBERTY *et al.*, 1998). Foram avaliadas as condições de estabilidade em um período de quatro dias em duas temperaturas: (5 ± 3) °C e (35 ± 2) °C. A cada dia quatro frascos que estavam estocados a ≤ -70 °C (temperatura de referência) foram selecionados aleatoriamente e foram acondicionados em duas caixas próprias para transporte de material biológico (dois frascos em cada caixa). As caixas foram incubadas nas temperaturas testadas, até um total de quatro dias. As condições de incubação de tempo e temperatura foram mantidas até a data de análise. Quatro dias após a data da primeira incubação, os frascos foram analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições, maximizando assim a repetitividade das análises. As metodologias utilizadas para enumeração dos micro-organismos foram as mesmas descritas no teste da homogeneidade (item 4.6).

A avaliação da estabilidade, de acordo com a ABNT ISO GUIA 35 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012) foi realizada pela análise de resíduos da regressão em conjunto com a Análise de Variância (Anova), que consiste em observar se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos apresenta algum tipo de tendência ao longo do tempo. Se a inclinação da reta não for significativa, ou seja, a concentração bacteriana não variar em função do tempo, o material é considerado estável (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle da concentração celular durante o preparo dos IE

A concentração dos micro-organismos não apresentou diferenças logarítmicas significativas após o processo de liofilização, exceto para o lote EC 16/17 (Tabela 2). Apesar do aumento da concentração celular de *E. coli* no momento da produção, houve decréscimo proeminente de 2 logs após o processo de liofilização. Com o lote piloto, EC 14/17, isso não ocorreu, mesmo sendo utilizada a mesma metodologia. Outros estudos são necessários para a compreensão da instabilidade desse micro-organismo na produção de IE. Para os outros lotes, os dados indicam que o processo de liofilização não teve efeito de queda significativa durante a produção dos IE e que a etapa do banho de gelo durante a contaminação microbiológica dos frascos contribuiu para evitar o crescimento dos micro-organismos.

Tabela 2 - Concentração dos micro-organismos (UFC/g) nos lotes antes e após o processo de liofilização.

Lotes	Concentração celular (UFC/g)			Percentual do lote com presença de vácuo (%)
	Concentração final esperada	Antes da liofilização	Após a liofilização	
SALM 08/17	$5,0 \times 10^3$	$4,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	87,8
SALM 09/17	$5,0 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	94,6
EC 14/17	$1,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	91,6
EC 16/17	$5,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	$6,9 \times 10^2$	92
BCSTA 04/17 - <i>B. cereus</i>	$1,0 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	90
BCSTA 04/17 - <i>S. aureus</i>	$5,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	90
BCSTA 05/17 - <i>B. cereus</i>	$1,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$8,3 \times 10^3$	95,9
BCSTA 05/17 - <i>S. aureus</i>	$5,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	$4,7 \times 10^3$	95,9

UFC: Unidades formadoras de colônia.

Fonte: (Do autor, 2019).

Na análise de vácuo, houve variação de 87,8 a 96% dos frascos analisados (Tabela 2). Os frascos que não apresentaram vácuo foram descartados. Este resultado foi similar aos obtidos em outros estudos que utilizaram a liofilização no preparo de IE para EP e detectaram

vácuo em, no mínimo, 83,3% dos frascos com vácuo de cada lote produzido (ROSAS *et al.*, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2013b,c; BRANDÃO *et al.*, 2014a,b; COSTA *et al.*, 2015).

5.2 Estudos de homogeneidade

A homogeneidade garante que os laboratórios participantes de um EP recebam IE que não apresentem diferenças significativas nos parâmetros a serem mensurados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2012). Neste estudo, todos os lotes apresentaram-se suficientemente homogêneos, segundo o Protocolo Harmonizado (Tabela 3). Esse resultado é coerente com estudos anteriores que utilizaram a técnica de liofilização para o preparo de IE com micro-organismos em matrizes como queijo e leite (BRANDÃO *et al.*, 2013a; BRANDÃO *et al.*, 2013b, c). Brandão e colaboradores (2014b) obtiveram êxito em produzir IE suficientemente homogêneos contendo *Salmonella* Enteritidis em matriz carne bovina crua.

Tabela 3 - Valores gerados em \log_{10} UFC/g e \log_{10} NMP/g no teste de homogeneidade dos lotes produzidos.

Lote	Micro-organismo	Método	Média (\log_{10}/g)	S ² _{am}	c	Resultado
SALM 08/17	<i>Salmonella</i>	Contagem em placa	3,05	0,01	0,01	SH
SALM 09/17		Contagem em placa	1,98	0,01	0,02	SH
EC 14/17	<i>E. coli</i>	Contagem em placa	1,54	0,01	0,03	SH
		NMP	1,46	0,02	0,04	SH
EC 16/17		Contagem em placa	2,92	0,00	0,01	SH
		NMP	2,84	0,01	0,06	SH
BCSTA 04/17	<i>B. cereus</i>	Contagem em placa	3,99	0,00	0,06	SH
	<i>S. aureus</i>	Contagem em placa	3,70	0,01	0,36	SH
BCSTA 05/17	<i>B. cereus</i>	Contagem em placa	3,98	0,01	0,02	SH
	<i>S. aureus</i>	Contagem em placa	3,71	0,00	0,02	SH

SH: Suficientemente homogêneo, NMP: Número Mais Provável, S²_{am}: valor da variância entre as amostras, c: valor crítico da homogeneidade.

Fonte: (Do autor, 2019).

5.3 Estudos de estabilidade

5.3.1 Estudo de Estabilidade de Longa Duração

O estudo de estabilidade verifica as possíveis variações que os IE de um lote possam sofrer, alterando a sua característica de homogeneidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Inicialmente foi realizada uma análise de tendência pela visualização dos gráficos de estabilidade apresentados (Gráficos 1 a 6). Nesta análise, foi constatado que o lote BCSTA 05/17, que apresentou queda vertiginosa do número de UFC/g de *B. cereus* após 49 dias estocado a (-20 ± 4) °C (Gráfico 6), e foi considerado insuficientemente estável. Posteriormente foi realizada a análise de regressão linear, que demonstrou que os IE foram considerados estáveis nos seis lotes avaliados (Tabela 4), embora a análise de tendência tenha indicado instabilidade no lote BCSTA 05/17. Apesar da concentração de UFC/g de *S. aureus* ter se mantido estável no lote BCSTA04/17, o declínio acentuado da concentração de *B. cereus* inviabilizou a utilização desse lote no EP. Em contraste com o lote final, o lote piloto BCSTA 04/17 apresentou estabilidade nas duas temperaturas estudadas. Isso pode ter ocorrido pois o período de análise de estabilidade do lote piloto foi inferior (38 dias) quando comparado ao lote final (49 dias). A importância do estudo de estabilidade de longa duração é evidenciada por esse resultado, pois, através de um período maior de dias de análise, pôde ser observado o comportamento de instabilidade dos micro-organismos na matriz, antes do envio para os laboratórios participantes do EP. O decréscimo do número de células de *B. cereus* no lote BCSTA 05/17 pode ter ocorrido devido a competitividade dos dois micro-organismos por nutrientes ao longo do tempo (GHOUL; MITRI, 2016), com prevalência de *S. aureus* em detrimento de *B. cereus*. O ágar MYP, utilizado para contagem de *B. cereus*, não possui inibidor para bactérias gram positivas (TALLENT *et al.*, 2012), logo *S. aureus* pode crescer nesse meio de cultura, apesar de suas colônias se diferenciarem de *B. cereus* pela fermentação do manitol e, conseqüentemente, coloração amarela. O meio Baird Parker, em contrapartida, possui alta concentração de sais, inibindo o crescimento de *B. cereus*. Possivelmente, por esse motivo, não foi observada alteração na contagem de *S. aureus* nos lotes produzidos.

Tabela 4 - Resultados do estudo de estabilidade na temperatura de ≤ -70 °C e (-20 ± 4) °C dos lotes produzidos.

Lote	Temperatura de estudo (°C)	Coefficiente angular	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)	Resultado
SALM 08/17	≤ -70	-0,0032	-0,057	0,050	SE ¹
	(-20 ± 4)	-0,00355	-0,01399	0,00690	SE
SALM 09/17	≤ -70	-0,00056	-0,0030	0,0018	SE
	(-20 ± 4)	0,00110	-0,00353	0,00574	SE
EC 14/17 (Contagem em placas)	≤ -70	-0,0054	-0,12	0,11	SE
	(-20 ± 4)	-0,01744	-0,03662	0,00174	SE
EC 14/17 (NMP ²)	≤ -70	-0,00057	-0,072	0,071	SE
	(-20 ± 4)	-0,01405	-0,03883	0,01073	SE
EC 16/17 (Contagem em placas)	≤ -70	0,00036	-0,0014	0,0022	SE
	(-20 ± 4)	-0,00140	-0,00325	0,00046	SE
EC 16/17 (NMP)	≤ -70	0,0020	-0,0027	0,0067	SE
	(-20 ± 4)	0,00039	-0,00223	0,00300	SE
BCSTA 04/17 (<i>B. cereus</i>)	≤ -70	-0,0032	-0,071	0,064	SE
	(-20 ± 4)	0,00154	-0,00579	0,00887	SE
BCSTA 04/17 (<i>S. aureus</i>)	≤ -70	0,0071	-0,0017	-0,12	SE
	(-20 ± 4)	0,00707	-0,00169	0,01583	SE
BCSTA 05/17 (<i>B. cereus</i>)	≤ -70	-0,010	-0,052	0,032	SE
	(-20 ± 4)	-0,05864	-0,13024	0,01296	SE
BCSTA 05/17 (<i>S. aureus</i>)	≤ -70	-0,0016	-0,0065	0,0033	SE
	(-20 ± 4)	0,00166	-0,00485	0,00817	SE

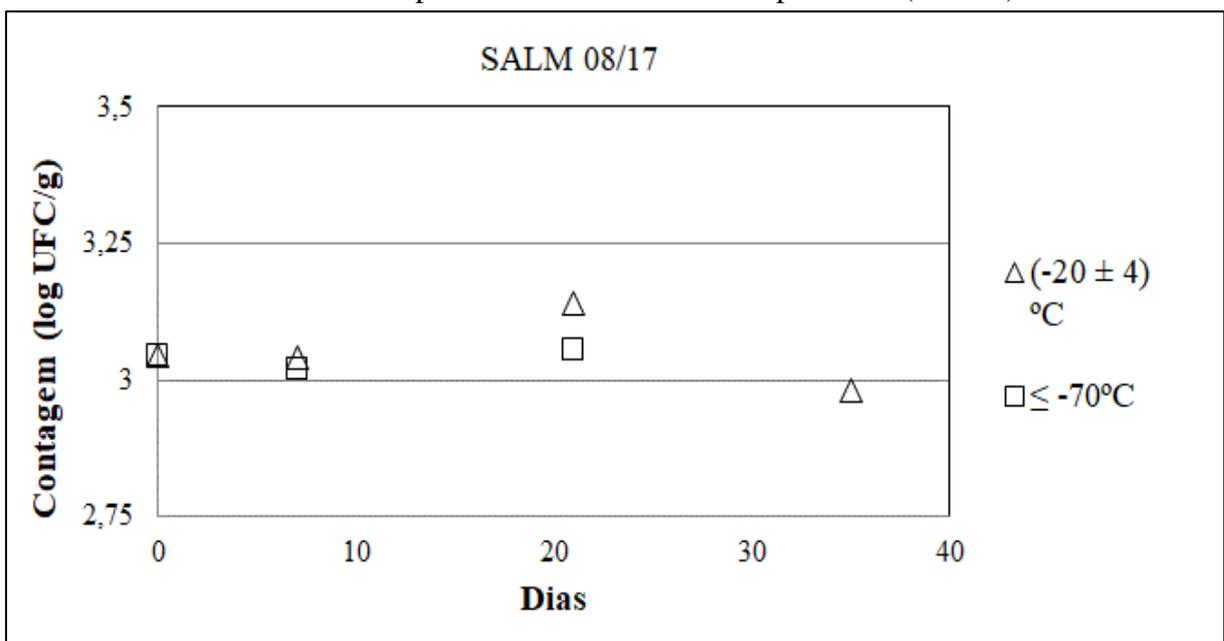
1- Suficientemente estável; 2- Número Mais Provável.

Fonte: (Do autor, 2019).

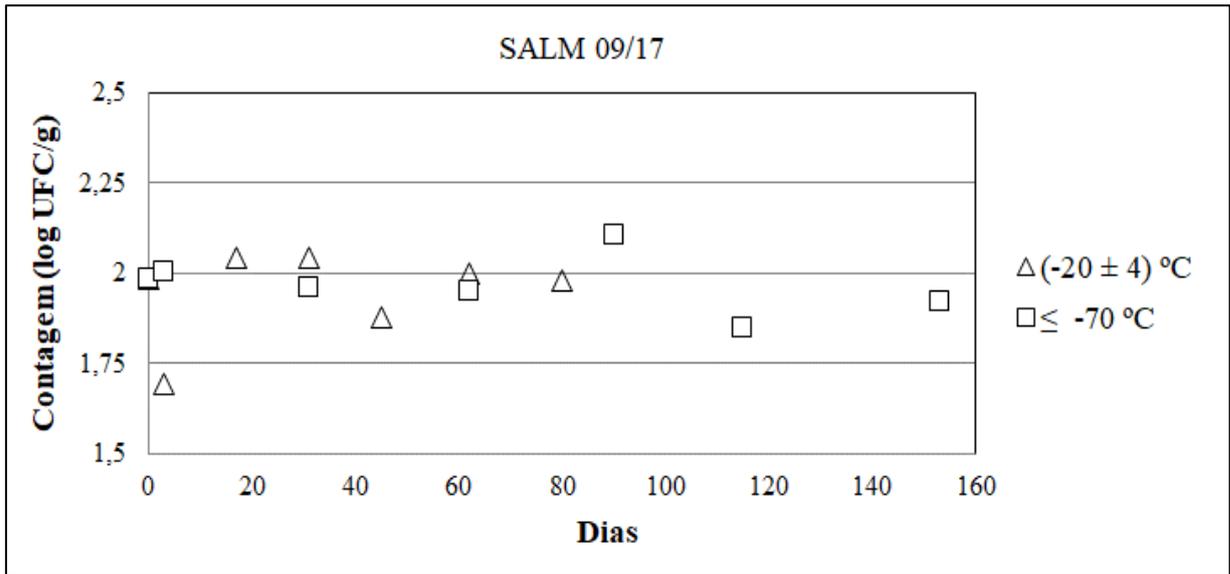
À temperatura de ≤ -70 °C, todos os lotes apresentaram-se estáveis pelo período estudado. No lote final SALM 09/18, os IE mantiveram-se estáveis por 153 dias a ≤ -70 °C e 80 dias a (-20 ± 4) °C (Gráfico 3 e Tabela 4). Com relação aos lotes contendo *E. coli*, o lote final EC 16/17 se manteve estável por 126 dias a ≤ -70 °C e 84 dias a (-20 ± 4) °C (Gráfico 4). Esses resultados revelam que a técnica utilizada de produção na matriz frango foi satisfatória. A estabilidade dos IE à temperatura de ≤ -70 °C por período expressivo demonstra que estes podem ser estocados tanto pelo laboratório produtor, quanto pelos laboratórios participantes do EP, por espaço de tempo longo com a segurança que a viabilidade não será perdida. Outros estudos relataram estabilidade de IE contendo coliformes termotolerantes (BRANDÃO *et al.*, 2013a; BRANDÃO *et al.*, 2013e) e *Salmonella* spp. (COSTA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017) em diferentes matrizes, como queijo, leite e chocolate, produzidos com a técnica de liofilização por tempo semelhante ou maior que o avaliado no presente estudo. Esses dados sugerem que a metodologia utilizada, que inclui a etapa de liofilização e utilização de crioprotetores, é adequada para preservação de IE de proficiência contendo estas bactérias.

A produção de IE estáveis a temperaturas (-20 ± 4) °C em período prolongado é importante devido ao fato de nem todos os laboratórios possuírem equipamentos para estocar os itens a ≤ -70 °C. Logo, esses laboratórios podem adquirir os IE e estocá-los em equipamentos usuais, como freezers comuns e usá-los em um prazo maior (BRANDÃO *et al.*, 2013b).

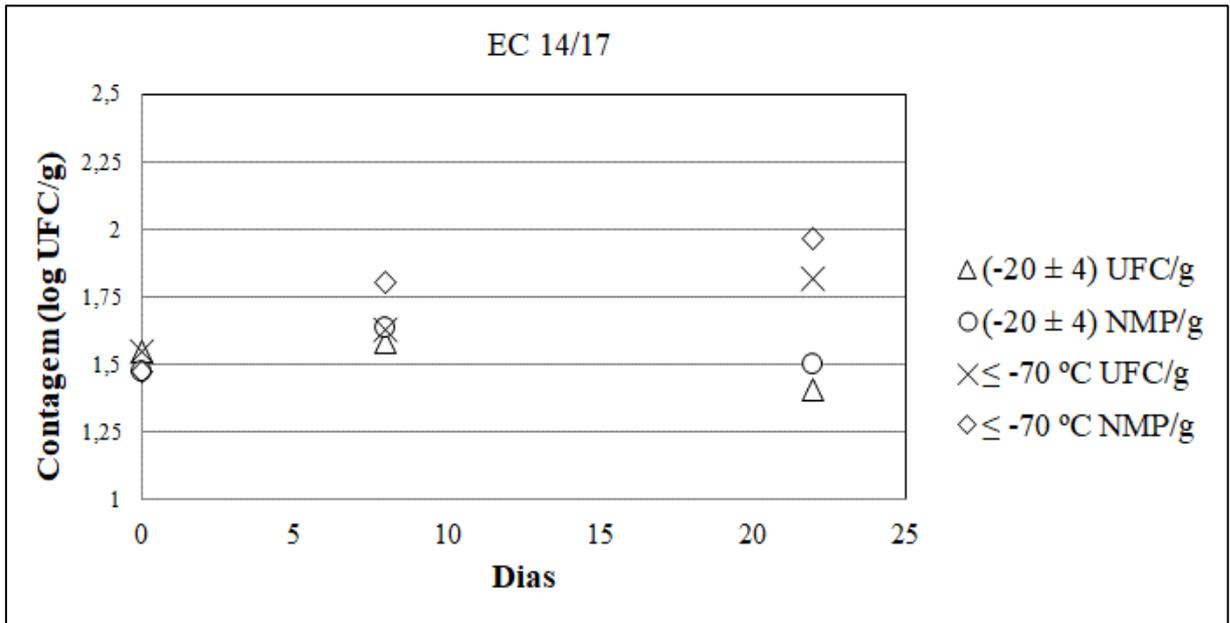
Gráfico 1 - Estabilidade do lote piloto SALM 08/17 nas temperaturas (-20 ± 4) °C e ≤ -70 °C.



Fonte: (Do autor, 2019).

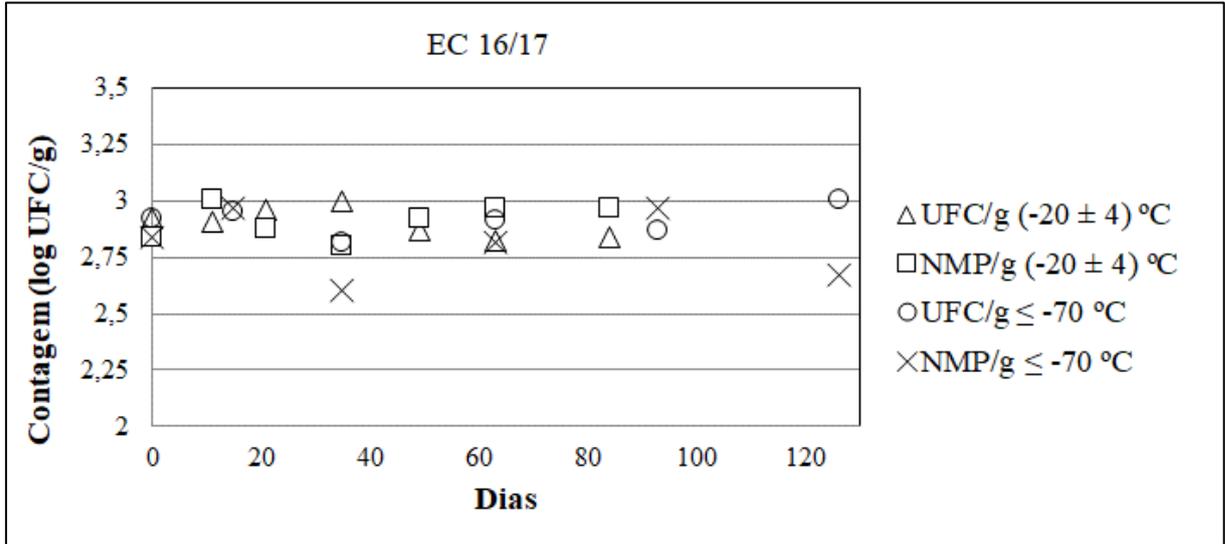
Gráfico 2 - Estabilidade do lote final SALM 09/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4)^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$.

Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 3 - Estabilidade do lote piloto EC 14/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4)^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$ pelo método de contagem em placas (UFC/g) e número mais provável (NMP/g).

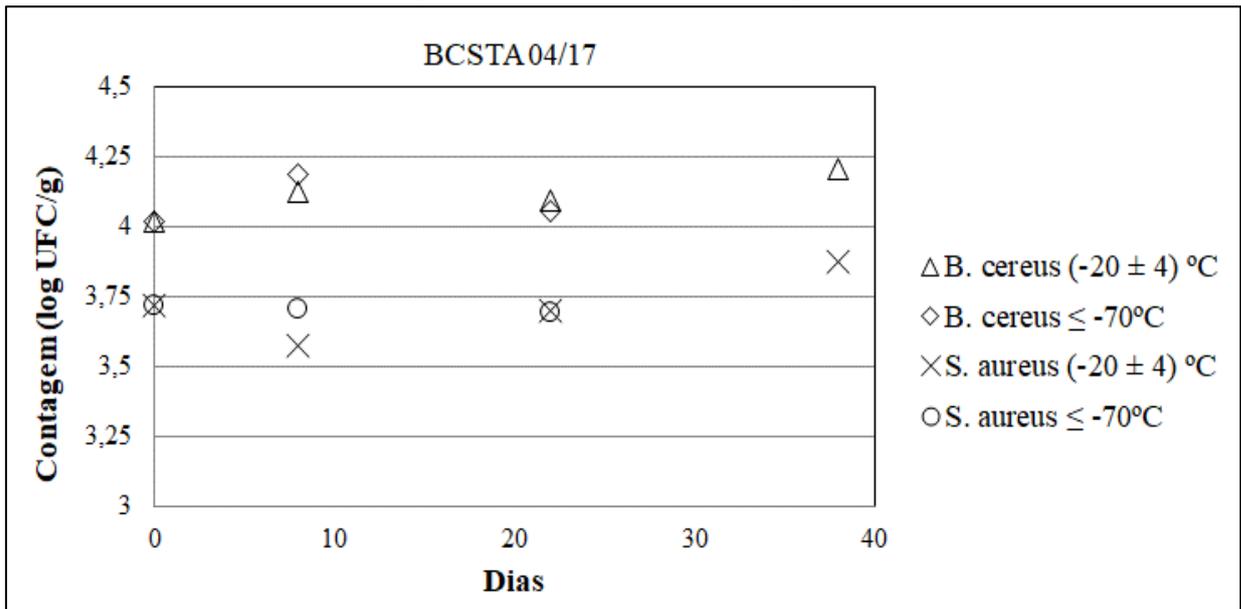
Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 4 - Estabilidade do lote final EC 16/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4)^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$ pelo método de contagem em placas (UFC/g) e número mais provável (NMP/g).

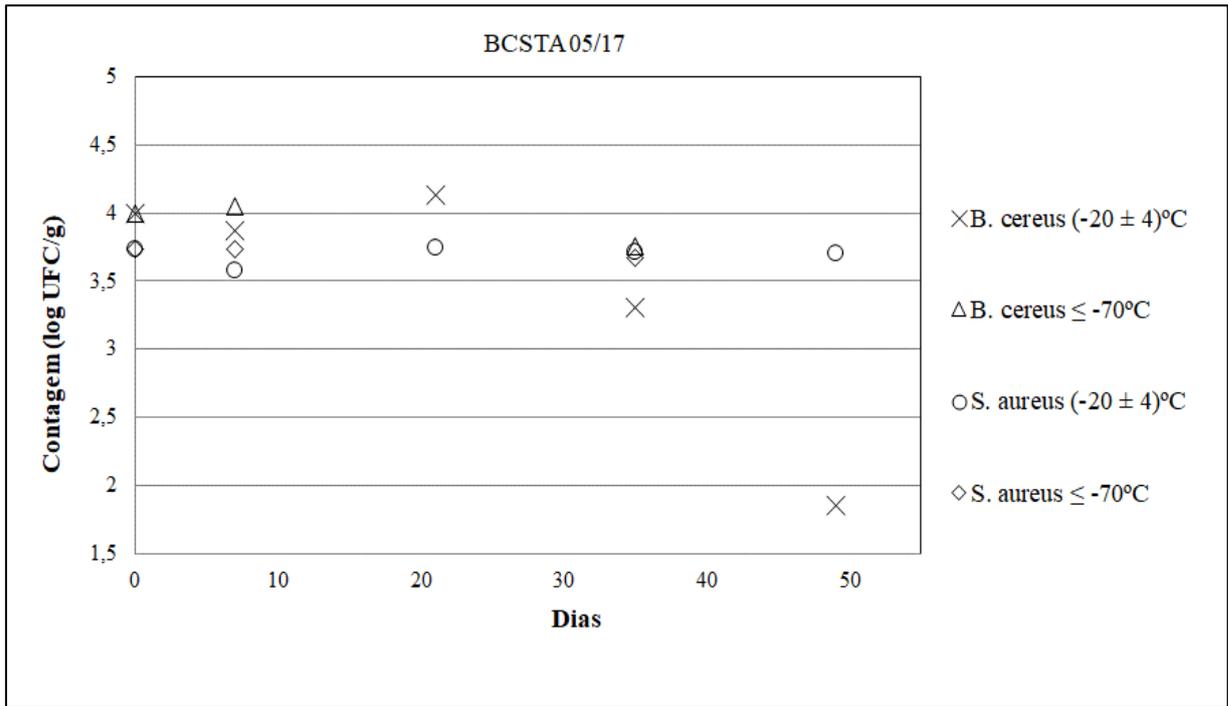


Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 5 - Estabilidade do lote piloto BCSTA 04/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4)^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$.



Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 6 - Estabilidade do lote final BCSTA 05/17 nas temperaturas $(-20 \pm 4)^\circ\text{C}$ e $\leq -70^\circ\text{C}$.

Fonte: (Do autor, 2019).

5.3.2 Estudo de Estabilidade de Curta Duração

Os resultados do estudo de estabilidade de curta duração obtidos a partir de análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 5. O lote de EC 16/17 apresentou-se suficientemente estável nas duas temperaturas estudadas tanto na avaliação do gráfico de tendência (Gráfico 7) quando pela análise de regressão linear (Tabela 5). Entretanto, o lote de SALM 09/17 apresentou-se suficientemente estável apenas na temperatura de $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ (Tabela 5). Isso indica que em quatro dias à temperatura de $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ a concentração dos micro-organismos se mantém viável para análise pelos laboratórios participantes. Em contrapartida, a $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ é necessário que haja rigoroso controle de temperatura de transporte para que a concentração celular não decresça e inviabilize o lote. Estudos anteriores não obtiveram resultados satisfatórios sob essas temperaturas em produção de IE contendo bactérias gram-negativas em diferentes matrizes (ROSAS *et al.*, 2010; BRANDÃO *et al.*, 2014b; BRANDÃO *et al.*, 2013a). Isso indica que o frango cozido desfiado, sob as condições utilizadas, é uma boa matriz para o desenvolvimento de IE com micro-organismos gram-negativos, pois estes se mantiveram estáveis mesmo a temperaturas superiores à de armazenamento, com exceção de *Salmonella* na temperatura de $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

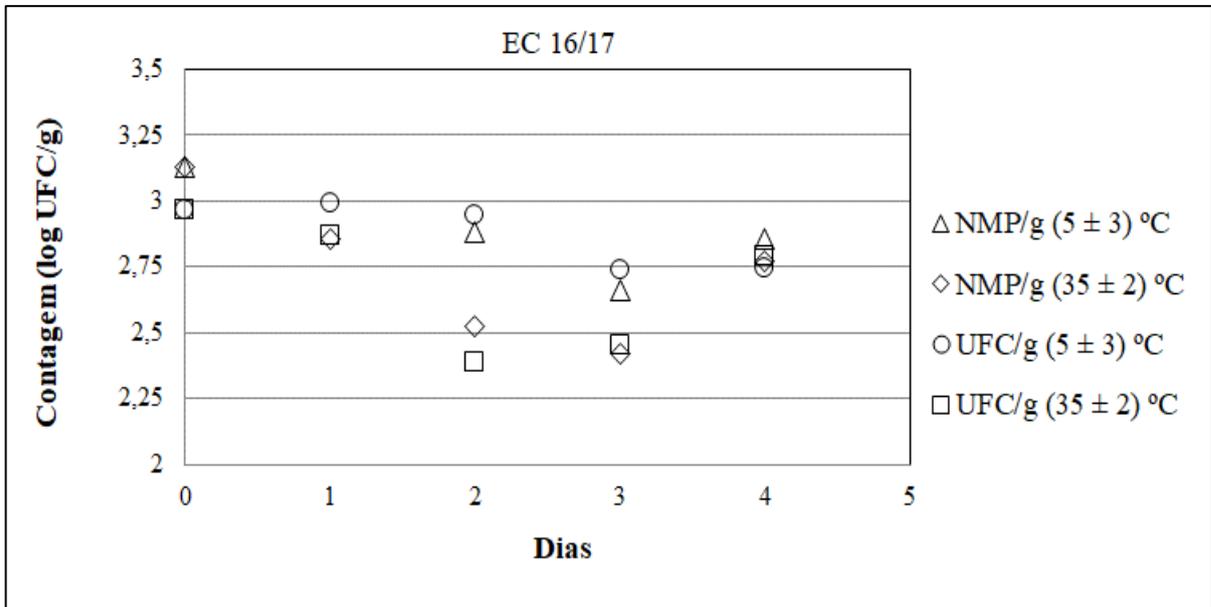
Tabela 5 - Resultados do estudo de estabilidade de curta duração nos lotes oficiais EC 16/17 e SALM 09/17.

Lotes	Temperatura (°C)	Coefficiente angular	Limite Inferior (95%)	Limite Superior (95%)	Resultado
EC 16/17 (UFC/g)	(5 ± 3)	-0,0693	-0,1393	0,0008	SE ¹
EC 16/17 (NMP/g)		-0,1640	-0,5527	0,2247	SE
SALM 09/17 (UFC/g)		-0,0317	-0,2682	0,2049	SE
EC 16/17 (UFC/g)	(35 ± 2)	-0,0763	-0,3404	0,1878	SE
EC 16/17 (NMP/g)		-0,1148	-0,3619	0,1324	SE
SALM 09/17 (UFC/g)		-0,1036	-0,1586	-0,0486	NE ²

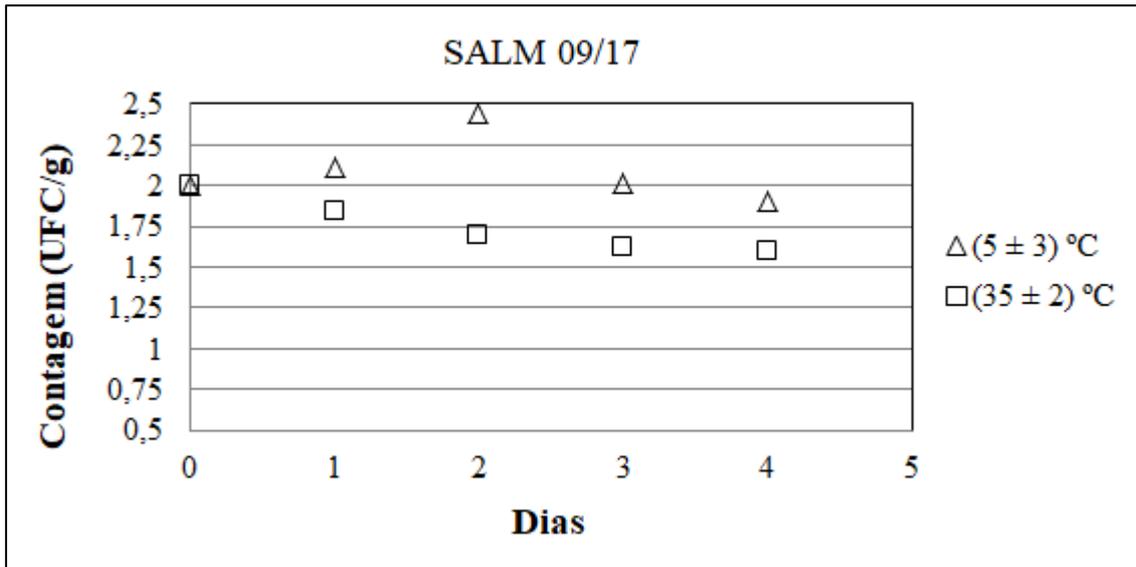
1-Suficientemente estável, 2- Não suficientemente estável.

Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 7 - Estabilidade do lote final EC 16/17 nas temperaturas (5 ± 3) °C e (35 ± 2) °C.



Fonte: (Do autor, 2019).

Gráfico 8 - Estabilidade do lote final SALM 09/17 nas temperaturas $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ e $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Fonte: (Do autor, 2019).

Como o transporte de materiais biológicos em temperatura de refrigeração é dispendioso, a obtenção de IE estáveis a temperaturas elevadas é importante para baratear o custo do envio, conseqüentemente, diminuindo o custo total da participação do laboratório no EP (BRANDÃO *et al.*, 2013d). Desta forma, mais estudos serão necessários para obtenção de lotes contendo *Salmonella* spp. em matriz frango estáveis a temperaturas de transporte mais elevadas.

6 CONCLUSÃO

- A matriz frango cozido desfiado, inédita na produção IE para utilização em EP, mostrou-se apropriada para esse fim de acordo com a metodologia e cepas utilizadas;
- A técnica de produção através da liofilização foi satisfatória nos lotes contendo apenas um micro-organismo, levando em consideração que se apresentaram homogêneos e estáveis por um período suficiente de dias analisados em temperatura de referência (≤ -70 °C) e de armazenamento (-20 ± 4) °C;
- O lote final contendo *E. coli* mostrou-se suficientemente estável nas temperaturas (5 ± 3) °C e (35 ± 2) °C durante quatro dias, o que revela que os laboratórios podem analisar os IE sob essas condições, pois os resultados ainda serão adequados para a comparação interlaboratorial. O lote final contendo *S. Enteritidis* mostrou-se suficientemente estável apenas a (5 ± 3) °C, indicando que cuidados com o transporte dos IE devem ser rigorosos de modo a não permitir excursão de temperatura, pois esta poderia comprometer a concentração do micro-organismo no IE;
- Devem-se aprofundar os conhecimentos acerca da interação entre duas bactérias na matriz frango, além da relação e influência da matriz sobre esses micro-organismos por tempo determinado. Dessa maneira, futuramente, poderão ser produzidos lotes mistos com homogeneidade e estabilidade suficientes para serem utilizados em EP.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. Rio de Janeiro, 2017
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2017**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. Food and drug administration – FDA. *In: Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)*. 8th ed. 2001. cap. 12.
- BLODGETT, R. Most Probable Number from Serial Dilutions. Food and drug administration – FDA. *BAM. Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)*. Appendix 2, 2010.
- BORTOLAIA, V.; ESPINOSA-GONGORA, C.; GUARDABASSI, L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, p. 130-140, 2016.
- BRANDÃO, M. L. L.; ROSAS, C.O; BRICIO, S.M.L.; MEDEIROS, V.M; COSTA, J.C.B.; PINHEIRO, R.R; CARDARELLI-LEITE, P.; DE LA CRUZ, M.H.C; NÓBREGA, A.W. Preparation of Reference Material for Proficiency Test for Enumeration of Coliforms in Cheese Matrix. **Detection**, v. 1, p. 7-12, 2013a.
- BRANDÃO, M.L.L.; COSTA, J.C.B.; FARIAS, F.M.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; NASCIMENTO, J.S.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. **Braz J Food Technol**, v. 16, n. 1, p.73-9, 2013b.
- BRANDÃO, M.L.L.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; COSTA, J.C.B.; MEDEIROS, V.M.; WARNKEN, M.B. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. **Rev Analytica**, v.63, p. 60-71, 2013c.
- BRANDÃO, M.L.L.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; COSTA, J.C.B.; VIEIRA, L.R.; MEDEIROS, V.M.; WARNKEN, M.B. Avaliação de matrizes de carne bovina na produção de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. **Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v. 25, n. 1, p. 13-18, 2014b.
- BRANDÃO, M.L.L.; COSTA, J.C.B; FARIAS, F.M.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; NASCIMENTO, J.S.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo *Listeria monocytogenes* em matriz queijo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.10, p.1905-1910, 2013d.
- BRANDÃO, M.L.L.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; COSTA, J.C.B.; MEDEIROS, V.M.; WARNKEN, M.B.; CRUZ, M.H.C.; NOBREGA, A.W. 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 Instituto Adolfo Lutz**. v. 72, n. 2, p. 124-30. 2013e.

BRANDÃO, M.L.L.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; COSTA, J.C.B.; MEDEIROS, V.M.; DE LA CRUZ, M.H.C.; NÓBREGA, A.W. 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, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf. Acesso em: 22 jul. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Marco-2018.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta pública nº 541 de 17/07/2018**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/378861>. Acesso em: 30 jan. 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta pública nº 542 de 17/07/2018**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/378862>. Acesso em: 30 jan. 2019b.

CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; CASTRO, A.G.M.; LUCIANO, R.L.; TESSARI, E.N.C. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano XIII, n. 24, 2015. ISSN: 1679-7353.

CIPROTTI, M.; SORBO, A.; ORLANDINI, S.; CIARALLI, L. Preparation of liquid milk for proficiency test and internal quality control for chemical elements in food. **Accred Qual Assur**, 2013.

COGAN, T. A.; BLOOMFIELD, S.F.; HUMPHREY, T.J. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of crosscontamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 29, n. p. 354-358, 1999.

COOK, A.; ODUMERU, J.; LEE, S.; POLLARI, F. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 34e40, 2012.

COSTA, J.C.B.; ROSAS, C.O.; BRICIO, S.M.L.; BRANDÃO, M.L.L.; MEDEIROS, V.M.; PINHEIRO, R.R.; MACHADO, M.A.A.; CRUZ, M.H.C.; NOBRECA, A.W.; COURI, S.

Preparo de Itens de Ensaio de Proficiência em Matriz Queijo para a Pesquisa de *Salmonella* spp. **Vigil. sanit. Debate**, v. 3, n. 3, p. 11-18, 2015

COSTA, M.C.; BRITO, L.L.; LESSA, I. Práticas alimentares associadas ao baixo risco cardiometabólico em mulheres obesas assistidas em ambulatórios de referência do Sistema Único de Saúde: estudo de caso-controle. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.23, n.1, p.67-78, 2014.

EDBERG, S.C.; RICE, E.W.; KARLIN, R.J.; ALLEN, M.J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 106S-116S, 2000.

EJO, M.; GAREDEW, L.; ALEBACHEW, Z.; WORKU, W. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Animal-Origin Food Items in Gondar, Ethiopia. **BioMed Research International**, p. 1-8, 2016.

ENVIRONMENT AGENCY. **The Microbiology of drinking water: part 1 - Water Quality and Public Health**. Almondsbury, 2002. (Methods for the Examination of Waters and Associated Materials).

EURACHEM GUIDE. Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes by Laboratories. 2011.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A; BUTKHARDT, W. Enumeration of *Escherichia coli* and Coliform Bacteria. *In*: FDA. **Bacteriological Analytical Manual online**. 2002. Chapter 4.

FERRAZ, R. R. N.; SANTANA, F. T.; BARNABÉ, A. S.; FORNARI, J. V. Investigação de surtos de doenças transmitidas por alimentos como ferramenta de gestão em saúde de unidades de alimentação e nutrição. **RACI, Getúlio Vargas**, v.9, n.19. 2015.

FOX, A.; PICHON, B.; WILKINSON, H.; DOUMITH, M.; HILL, R.L.R; MCLAUCHLIN, J.; KEARNS, A.M. Detection and molecular characterisation of Livestock-Associated MRSA in raw meat on retail sale in North West England. **Lett Appl Microbiol**, v.64, n. 3, p. 239-245, 2017.

FUNG, F; WANG, H.; MENON, S. Food safety in the 21st century. **Biomedical Journal**, p. 88-95, 2018.

GHOUL, M.; MITRI, S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 10, p. 833-845, out. 2016.

GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W.M; H. U. KIM. *Bacillus cereus*: Food poisoning organism. A review. **J. Milk Food Technol.**, v. 35, p. 213-227, 1972.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C.C. A study of crosscontamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 76, p. 143-150, 2002.

HOFFMANN, S; MACULLOCH, B; BATZ, M. Economic Burden of Major Foodborne Illnesses Acquired in the United States. **Current Politics and Economics of the United States, Canada and Mexico**, v. 17, p. 543-616, 2015.

HUANG, J.; ZONG, Q.; ZHAO, F.; ZHU, J.; JIAO, X. Quantitative surveys of Salmonella and Campylobacter on retail raw chicken in Yangzhou, China. **Food Control**, v. 59, p. 68e73. 2016.

HUTCHINSON, J.A.; WHEELER, C.; MOHLE-BOETANI, J.C. Outbreak epidemiologically linked with a composite product of beef, mechanically separated chicken and textured vegetable protein contaminated with multiple serotypes of Salmonella enterica including multidrug-resistant infantis, California 2016. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 4, p. 430-436, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 2ª rodada: MIB02/11**. Rio de Janeiro, 2012a.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 3ª rodada: MIB03/11**. Rio de Janeiro, 2012b.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 4ª rodada: MIB04/11**. Rio de Janeiro, 2012c.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGRE-001: orientação para acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaio de proficiência**. Brasília, 2012.

IN'T VELD PH, HAVELAAR AH, VAN STRIJP-LOCKEFEEER NGWM. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. **J Appl Microbiol**, v. 86, n. 2, p. 266-74, 1999.

KADARIYA, J; SMITH, T.C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **Biomed Res Int**, p. 827965, 2014.

KOCH, M.; BREMSER, W.; KOPPEN, R.; KRUGER, R.; RASENKO, T.; SIEGEL, D.; NEHLS, I. Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. **Accred Qual Assur**, v. 16, p. 429-437, 2011.

KRAMER, J. M.; GILBERT R.J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: DEKKER, Marcel (ed.). **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: M. P. Doyle, 1989. p. 21-70.

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

LENTZ, S.A.M.; RIVAS, P.M.; CARDOSO, M.R.I.; MORALES, D.L.; CENTENARO, F.B.; MARTINS, A.F. *Bacillus cereus* as the main casual agente of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Cad. Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. e00057417, 2018.

LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

MANOJ, J.; SINGH, M.K.; SINGHYP. The role of poultry in food borne salmonellosis and its public health importance. **Adv. Anim. Vet. Sci.**, v. 3, n. 9, p. 485-490, 2015.

MCDOWELL R.H.; FRIEDMAN, H. *Bacillus Cereus*. **Treasure Island (FL)**. StatPearls Publishing, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>. Acesso em: 20 dez. 2018.

MONTEZANI, E; GIUFFRIDA, R; ANDRADE, R.A.P.; SILVA, B.L. Isolamento de *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* em carne de frango e condições dos estabelecimentos comerciais no município de tupã-SP. **Colloq Vitae**, v. 9, n. 2, p. 30-36, 2017.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.2, p.183-193, maio 2006.

NORTHCUTT, J.K.; BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Effect of broiler age, feed withdrawal and transportation on levels of coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on carcasses before and after immersion chilling. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 169-173, 2003.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne: aspectos higiênico-sanitários da carne**. Zoonoses mais comuns adquiridas profissionalmente por manipuladores de carne. 2.ed. Goiânia: CEGRAF-UFG/Niterói: EDUFF; p.358-9, 2006. v. 1.

PARUCH, A.M; MÆHLUM, T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. **Ecological Indicators**, v. 23, p. 140-142, 2012.

PHILIPP, W.J.; IWAARDEN, P.V.; SCHIMMEL, H.; MEEUS, N.; KOLLMORGEN, N. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 12, n. 3-4, p. 134-138, 2007.

RICKE, S.C.; KOO, O.K; FOLEY, S.; NAYAK, R. *Salmonella*. In: Labbé RG, García S. editors. **Guide to Foodborne Pathogens**. 2. ed. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell, p. 112-37, 2013.

RISTORI, C.A.; ROWLANDS, R.E.G; MARTINS, C.G; BARBOSA, M.L.; SANTOS, L.F.; JAKABI, M.; FRANCO, B.D.G.M. Assessment of Consumer Exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. **Foodborne pathogens and disease.**, v. 0, n. 0, 2017.

ROSAS, C.O.; BRANDÃO, M.L.L.; BRICIO, S.M.L.; MEDEIROS, V.M.M.; BERNARDO, S.P.C.; DE LA CRUZ, M.H.C.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.

SALEH, E.A.; EL-MOHSEN, E.G.A.; IBRAHIM, M.S. Molecular Identification of *Staphylococcus aureus* in Imported Frozen and Locally Slaughtered Meat. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 51, n. 1, p. 162-169, 2016.

SALES, W.B.; BERLANDA, P.L.; PISSATA, A.; VASCO, J.; CAVEIAO, C. Avaliação Microbiológica da Carne de Frango. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 12, p. 40, 2014.

SILVA, M.L.C.; BRANDÃO, M.L.L.; ROSAS, C.O.; MEDEIROS, V.M.; SILVA, C.C.; TAVARES, R.D.O.; LOPES, S.M.R.; CARDARELLI-LEITE, P. Desenvolvimento de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz chocolate. **Visa em debate.**, v. 5, n. 2, p. 106-112. 2017

STEVENS, M.; ASHBOLT, N.; CUNLIFFE, D. Review of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Recommendations to Change the Use of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Australian Government National Health and Medical Research Council. **Biotext Pty Ltd**, 2003.

TALLENT, S.M.; RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M.; BENNET, R.W. A. *Bacillus cereus*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)**. 8th ed., 2012. cap. 14.

TAYLOR, A.L.; MURPHREE, R.; INGRAM, L.A.; GARMAN, K.; D'COFFEY, S.; WALKER, D.; ROGERS, M.; MARDER, E.; BOTTOMLEY, M.; WORON, A.; THOMAS, L.; ROBERTS, S.; HARDIN, H.; ARJMANDI, P.; GREEN, A.; SIMMONS, L.; CORNELL, A.; DUNN, J. Multidrug-resistant *Salmonella* Heidelberg associated with mechanically separated chicken at a correctional facility. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 950-9525, 2015.

THANIGAIVEL, G.; ANANDHAN, A.S. Isolation and Characterization of Microorganisms from Raw Meat Obtained from Different Market Places in and Around Chennai. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 295-301, 2015. ISSN: 2348-7658.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v.78, n.1, p.145-196, 2006.

UDDIN, M.N.; MUHAMMAD; FAROOQ, M.; WAQAS, M; KHAN, N.U.; KHAN, W.A; KHAN, I.; KARIM, N.; RIZWAN, M. Antibiotic assays of *Salmonella* isolated from poultry chicken of various locations in districts Swat. **Pure and Applied Biology**. v. 7, n. 1, p 78-84, 2018.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, FOOD SAFETY INFORMATION. **Serotypes profile of *Salmonella* isolates from meat and poultry products – January 1998 through December 2014**, 2016. Disponível em:

<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/3866026a-582d-4f0e-a8ce-851b39c7390f/Salmonella-Serotype-Annual-2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 22 jul. 2018.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Food Safety Information. Chicken from Farm to Table**, 2014. Disponível em: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/ad74bb8d1dab-49c1-b05e-390a74ba7471/Chicken_from_Farm_to_Table.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 19 fev. 2018.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Washington, DC., 2016. Disponível em: http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf. Acesso em: 15 jun. 2018.

VAIDYA, D.N.; GHUGARE, P.S.; KUTTY, M. Prevalence of pathogens in raw chicken sold at retail poultry shops in Pune City, India. **Journal of Global Biosciences**, v. 5, n. 4, pp. 3970-3975, 2016. ISSN 2320-1355.

VON SPERLING, M., Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal. **Biological Wastewater Treatment**. IWA Publishing, London, 2007. v. 1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy and action plan on ageing and health 2016-2020**. 2015. 27p. Disponível em: <http://www.who.int/ageing/GSAP-Summary-EN.pdf>. Acesso em: 22 de jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strategic Plan for Food Safety Including Foodborne Zoonoses 2013-2022**, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/strategic-plan/en/>. Acesso em: 22 de jul. 2018.

YENI, F; YAVAŞ, S.; ALPAS, H; SOYER, Y. Most common foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce: a review of recent outbreaks. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 56, p. 1532-1544, 2015.