

PRODUÇÃO DE MATERIAIS DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EM ALIMENTOS: ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA E *LISTERIA SPP.* EM LEITE EM PÓ

PRODUCTION OF REFERENCE MATERIALS FOR EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL METHODS: COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCUS AND *LISTERIA SPP.* IN MILK POWDER

RESUMO

A qualidade dos ensaios realizados nos laboratórios de microbiologia de alimentos é um importante fator no que se refere ao comércio internacional de produtos e à garantia da inocuidade dos alimentos, para que não representem risco à saúde do consumidor. Destaca-se a importância da elaboração de estudos referentes à produção de materiais de referência (MR) para ensaios de proficiência nessa área. O objetivo desse trabalho foi produzir e avaliar a qualidade de dois lotes de MR contendo *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua* em matriz leite pela técnica de liofilização tendo a sacarose como crioprotetor. Os MR foram considerados homogêneos e estáveis à temperatura de -70°C durante aproximadamente oito meses. Concluiu-se que o uso da sacarose e a técnica de liofilização foram satisfatórios para a produção dos MR.

Palavras-chave: Estafilococos. *Listeria* spp. Material de Referência. Leite. Produção.

ABSTRACT

The quality of assays performed at food microbiology laboratories is an important factor with regard to international trade of products and ensuring food safety in order to avoid risk to consumers' health. We emphasize the importance of conducting studies on the production of reference materials (RM) for proficiency testing in this area. The aim of this study was to produce and evaluate the quality of two RM lots containing *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua* in milk by freeze-drying technique with sucrose as a cryoprotector agent. The RM was considered homogeneous and stable at temperature -70°C for approximately eight months. It was concluded that the use of sucrose and freeze-drying technique were satisfactory for the MR production.

Keywords: Staphylococcus. *Listeria* spp. Reference Material. Milk. Production.

INTRODUÇÃO

Laboratórios que realizam o controle microbiológico de alimentos apresentam importante papel no que se refere à garantia da segurança dos alimentos e conseqüentemente, na prevenção de doenças (ROBERTS, 1999). Resultados inadequados podem gerar problemas de saúde pública, interpretações erradas de pro-

cessos de produção e perdas econômicas, (CAMARGO, 2006) (PIZZOLATO *et al*, 2008). Como forma de avaliação das análises laboratoriais, provedores de Ensaio de Proficiência (EP) disponibilizam Materiais de Referência (MR) destinados a ensaios de detecção ou enumeração de microrganismos em alimentos, em

Marcelo Luiz Lima Brandão*,
Carla de Oliveira Rosas,
Sílvia Maria Lopes Bricio,
Juliana de Castro Beltrão da
Costa,
Valéria de Mello Medeiros e
Márcia Barbosa Warnken

Departamento de Microbiologia –
Instituto Nacional de Controle de
Qualidade em Saúde/Fundação
Oswald Cruz

*Correspondência
marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

A PÓS GRADUAÇÃO
que conecta você
com a evolução e o futuro do
MERCADO FARMACÊUTICO.



ICTQ

Instituto de Ciência, Tecnologia e
Qualidade

100% exclusivo do mercado farmacêutico

www.ictq.com.br / 0800 602 6660

Aulas presenciais nas cidades: São Paulo - SP / Campinas - SP / Porto Alegre - RS / Recife - PE
Anápolis - GO / Fortaleza - CE / Rio de Janeiro - RJ / João Pessoa - PB

Varejo Farmacêutico / Indústria Farmacêutica / Logística Farmacêutica / Hospitais / Agências Regulatórias

programas contendo diferentes rodadas (PETERZ & STENERYD, 1993) (FIOCRUZ, 2012). Em países desenvolvidos, como França e Inglaterra, a participação em EP se encontra incorporada às práticas laboratoriais, de forma que a qualidade das análises possa ser avaliada por acompanhamento anual (ROBERTS, 1999) (AUGUSTIN & CARLIER, 2012). O uso de MR é amplamente aceito como ferramenta indispensável para a comparação dos resultados de análises, sendo um dos pilares para um criterioso controle de qualidade metodológico (ABNT, 2000) (PHILIPP *et al.* 2007). A participação em EP propicia aos laboratórios a comprovação de obtenção de resultados confiáveis e monitoramento do seu desempenho (FIOCRUZ, 2012), além de ser uma atividade utilizada na avaliação dos laboratórios por organismos acreditadores e reguladores (PIZZOLATO *et al.*, 2008).

Os MR devem apresentar características de homogeneidade e estabilidade (THOMPSON *et al.*, 2006). O estudo de homogeneidade visa garantir que os laboratórios recebam analitos sem diferenças significativas nos parâmetros a serem medidos, enquanto o estudo de estabilidade visa a manutenção das propriedades do MR produzido, ao longo do tempo (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006). As propriedades do MR podem ser qualitativas ou quantitativas (FIOCRUZ, 2012) (ABNT, 2000). Os MR qualitativos são utilizados em análises onde se pesquisa a presença do microrganismo alvo no alimento, como no caso de patógenos como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (PHILIPP *et al.* 2007). Já os quantitativos visam avaliar a capacidade do laboratório de enumerar o(s) microrganismo(s) alvo(s) de forma precisa e exata (FIOCRUZ, 2012).

O grande desafio na produção de MR destinados a ensaios microbiológicos é a instabilidade natural dos microrganismos, que dificulta o desenvolvimento, a manutenção e o uso desses materiais (PHILIPP *et al.* 2007), (HAYES, 1996), (IN'T VELD, 1998). A oferta de MR em microbiologia de alimentos no Brasil ainda é restrita e isso faz com que os laboratórios brasileiros busquem a participação em EP internacionais. Entretanto, esse processo é dificultado pela burocracia de importação e pela fiscalização alfandegária brasileira, que muitas vezes retém o MR, comprometendo a data limite do início da análise e a integridade do MR. Além disso, a participação de laboratórios brasileiros em EP internacionais facilita a divulgação dos resultados obtidos para o exterior (FIOCRUZ, 2008), (MONTEIRO, 2010). Logo, o incentivo à capacitação de instituições científicas como produtores de MR é de extrema importância para o país (FINEP, 2012).

Dentre os métodos de produção de MR, a liofilização é o processo mais indicado para o preparo de materiais envasados em embalagens individuais, cujo número de células necessita ser precisamente preservado (MORGAN *et al.*, 2006). Sua principal vantagem é permitir a estocagem dos líofilos por longos períodos com baixo risco de contaminação (MORGAN *et al.*, 2006), (CARVALHO *et al.*, 2004). Contudo, esses métodos causam danos às células microbianas e a taxa de sobrevivência de muitos microrganismos após a reidratação é baixa (MORGAN *et al.*, 2006). Como forma de contornar esses problemas, alguns autores destacam a importância do uso de crioprotetores, como carboi-

dratos, durante os processos de congelamento e dessecação, com o objetivo de aumentar a viabilidade das células bacterianas (MORGAN *et al.*, 2006), (CARVALHO *et al.*, 2004), (HUBÁLEK, 2003), (ROSAS *et al.*, 2011), (WESSMAN *et al.*, 2011). A sacarose tem sido um dos carboidratos mais utilizados, apresentando resultados satisfatórios na produção de MR contendo bactérias (ROSAS *et al.*, 2011), (VIEIRA, 2012).

Os EP destinados a ensaios microbiológicos, geralmente, contêm patógenos ou microrganismos indicadores, parâmetros que também estão contemplados nas legislações. No caso do Brasil, a RDC n.º 12 é o regulamento técnico que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (Diário Oficial, 2001). Para leite em pó, esta resolução estabelece o limite de $10^2/g$ de estafilococos coagulase positiva (ECP) para amostras indicativas. O leite é um alimento produzido e consumido em grande escala no Brasil. Até o 3º trimestre de 2011 foram adquiridos 15.857.223 bilhões de litros de leite cru e 15.788.385 de leite industrializado, representando um aumento de 3,2% em relação ao mesmo período do ano anterior (IBGE, 2012). Esse produto possui forte controle de inspeção sanitária, sendo realizado nas três esferas do governo (Federal, Estadual e Municipal). Entretanto, no caso de falhas no controle e/ou produção, diversos patógenos podem ser veiculados pelo leite. No Brasil, de 2000 até 2011, foram registrados, pela Secretaria de Vigilância em Saúde, 7.234 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) sendo que 350 destes (4,84%), foram associados ao consumo de leite e derivados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Leite e derivados são comumente relacionados a intoxicações causadas por estafilococos (LANCETTE, 2001), (SILVA, 2007). Quando o produto não é pasteurizado ou quando ocorrem falhas na pasteurização, células de *Staphylococcus aureus* podem permanecer no produto. A contaminação do leite por essas bactérias ocorre, geralmente, devido a mastites estafilocócicas nos animais de produção (LANCETTE, 2001), 27). Até o momento, pelo menos 50 espécies e subespécies de ECP foram descritas. O grupo é composto por seis espécies principais (28), sendo que o *S. aureus* subsp. *aureus* é o principal agente causador de surtos de DTA (LANCETTE, 2001), (FRANCO & LANDGRAF, 2002), (HENNEKINNE *et al.*, 2010). A intoxicação causada por ECP é provocada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2002), (HENNEKINNE *et al.*, 2010). Além disso, outros patógenos podem ser encontrados no leite, como a *L. monocytogenes* (RYSER *et al.*, 2001), (JAY, 2005). Apesar da listeriose ser relativamente rara, essa infecção possui taxa de mortalidade de 20% a 30% (NEWLL *et al.*, 2010). *L. monocytogenes* age como um patógeno oportunista, afetando principalmente indivíduos pré-dispostos que possuam doenças que deprimem o sistema imunológico (RYSER *et al.*, 2001), (JAY, 2005), (NEWLL *et al.*, 2010). Em grávidas pode provocar aborto ou nascimento prematuro do feto (RYSER *et al.*, 2001), (NEWLL *et al.*, 2010).

Tendo em vista a necessidade da disponibilização de MR para a efetiva garantia da qualidade dos resultados dos laboratórios brasileiros envolvidos no controle microbiológico de alimentos, o objetivo do trabalho foi produzir e avaliar a qualidade de dois

lotes de MR. Um lote contendo *Listeria* spp. e outro contendo *S. aureus*, ambos em matriz de leite em pó, produzidos pela técnica de liofilização, utilizando a sacarose como crioprotetor. Estes MR poderão ser disponibilizados em um EP em nível nacional de forma a contribuir para a garantia da qualidade analítica dos laboratórios brasileiros na área de microbiologia de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Para a produção dos MR, foram selecionadas duas cepas bacterianas, uma de *S. aureus* subsp. *aureus* e uma de *Listeria innocua*, da coleção de pesquisa do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

A cepa de *S. aureus* foi isolada a partir de queijo tipo “ricota”, de acordo com a metodologia descrita por Lancette e Bennett (2001) e identificada pelo Sistema VITEK 2 V. 04.02 (bioMérieux).

A cepa de *L. innocua* foi isolada a partir de uma amostra de carcaça de frango resfriada de acordo com a metodologia descrita por Hitchins e Jinneman (HITCHINS & JINNEMAN, 2011). O isolado foi caracterizado como *L. innocua* sorovar 6a por sorologia clássica, pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. A utilização dessa espécie teve como objetivo estudar e avaliar o comportamento de uma cepa do gênero *Listeria* em matriz leite, com a perspectiva de posteriormente produzir um MR contendo o patógeno *L. monocytogenes*.

Produção dos materiais de referência

Foram produzidos dois lotes de MR, um lote contendo um *S. aureus*, identificado como “STA01”, e outro contendo *L. innocua*, identificado como “LIST01”. Cada lote foi composto por 104 unidades.

S. aureus: lote STA01

A cepa de *S. aureus* foi cultivada em caldo infusão cérebro-coração (Merck) e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Dois mililitros da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min (Eppendorf, EUA) e o sedimento ressuspensão em 2 mL de solução salina peptonada (SSP) a 0,1% (Merck). A concentração de células foi ajustada em fotolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm até uma transmitância de 2% e diluída em SSP a 0,1%. Dois mililitros desta suspensão foram adicionados a um bécher contendo 198 mL de solução de leite desnatado a 10% (Skim Milk - Difco) contendo 100 mM de sacarose (Merck), atingindo uma concentração final de aproximada de 10^5 células/mL. Volumes de 1,0 mL da suspensão foram distribuídos em frascos de vidro estéreis com capacidade de 4 mL. Após a distribuição, rolhas de borracha estéreis próprias para liofilização foram posicionadas nos frascos, de modo que os orifícios laterais das rolhas ficassem expostos. Os frascos foram congelados em ultrafreezer (Thermo, EUA) e

submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas em aparelho liofilizador K105 (Liotop, BRASIL). Ao término da liofilização os frascos foram fechados sob vácuo e lacrados com tampa metálica. Os frascos do lote foram identificados e estocados em ultrafreezer (Thermo, EUA). A partir da suspensão de inóculo, foram preparadas diluições decimais em SSP a 0,1% e 1 mL foi semeado, pela técnica *pour-plate*, em duplicata, em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Difco). As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Essa quantificação foi realizada com objetivo de determinar a concentração de células inoculadas nos frascos.

L. innocua: lote LIST01

A cepa de *L. innocua* foi cultivada em caldo tripticaseína de soja (Difco) contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Conforme descrito anteriormente, foi preparada uma suspensão da cultura bacteriana com transmitância de 6%. Esta suspensão foi diluída em SSP a 0,1% e utilizada para a contaminação da solução de leite desnatado. Posteriormente foi realizada a distribuição nos frascos, conforme descrito anteriormente. O controle da concentração de células foi realizado a partir da suspensão de inóculo. Foram preparadas diluições decimais e 1 mL foi semeado pela técnica *pour-plate*, em duplicata, em TSA contendo 0,6% de extrato de levedura. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Controle da qualidade dos materiais de referência

Os lotes de MR produzidos foram submetidos aos ensaios de controle para a verificação dos requisitos necessários a um MR.

Inspeção visual e verificação de vácuo

Após a liofilização foi realizada uma inspeção visual de todas as unidades dos lotes. Foram observados o aspecto das amostras liofilizadas e a possível presença de liquefação ou caramelização das amostras. Posteriormente foi realizada a verificação do vácuo em todos os frascos, utilizando um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, 2-12-8, BRASIL). Os frascos não aprovados na inspeção visual e na detecção de vácuo foram descartados.

Estudo da homogeneidade

A homogeneidade de cada lote foi realizada a partir da contagem do número de células de 10 frascos sorteados aleatoriamente pelo programa Microsoft Office Excel® 2010.

Os frascos foram retirados do ultrafreezer e acondicionados em temperatura ambiente durante 30 min. Após este período, os frascos foram hidratados com 1 mL de SSP a 0,1%, homogeneizados e diluídos em solução SSP a 0,1% até a diluição 10^{-2} . Para os frascos do lote STA01, volumes de 0,1 mL foram semeados, em duplicata, em superfície de ágar Baird Parker (Difco). Para os frascos do

lote LIST01, volumes de 1 mL foram semeados pela técnica *pour-plate* em TSA contendo 0,6% extrato de levedura. As placas foram incubadas, em posição invertida, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias presentes nas placas.

Os resultados das contagens do número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL foram expressos em \log_{10} e submetidos à análise estatística segundo as orientações do Protocolo Harmonizado (THOMPSON *et al.*, 2006) e da norma ISO 13528 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006).

Estudo da estabilidade

O estudo da estabilidade dos MR foi realizado por um período de aproximadamente oito meses de estoque na temperatura aproximada de -70°C . A cada ensaio, seis frascos do lote foram sorteados aleatoriamente e submetidos à contagem, em condições de repetitividade, conforme descrito no estudo da homogeneidade. A média das contagens obtidas durante o estudo da homogeneidade foi considerada como tempo “zero” de armazenamento.

A avaliação estatística dos resultados foi realizada através de regressão linear utilizando o programa Microsoft Office Excel® 2010, segundo os critérios descritos na ISO GUIDE 35 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006). Este teste estatístico avalia a variação da estabilidade dos analitos ao longo do tempo. Caso não ocorra variação da concentração do analito em função do tempo, o material é considerado estável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da qualidade dos materiais de referência

Inspeção visual das amostras liofilizadas

Nenhuma amostra apresentou colapso ou caramelização após o procedimento de liofilização. Todos os líofilos apresentaram coloração branca com ausência de brilho, conforme visualizado na Figura 1.

Verificação do vácuo

Foi detectado vácuo em 93,3% dos frascos do lote STA01 e em 92,3% dos frascos do lote LIST01, como visto na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da detecção de vácuo após o processo de liofilização

Lote	Fracos que não apresentaram vácuo (%)	Fracos que apresentaram vácuo (%)	Total
STA01	7 (6,7)	97 (93,3)	104
LIST01	8 (7,7)	96 (92,3)	104



Figura 1. Frascos contendo o material de referência após o processo de liofilização. (A) Lote STA01, (B) Lote LIST01

Resultados similares foram obtidos por Rosas *et al.* (2010), que ao utilizarem o mesmo processo de liofilização na produção de dois lotes de MR contendo *Salmonella* Enteritidis em leite, obtiveram um percentual de 100 e 99,2% de vácuo nos lotes. Monteiro (2010) ao produzir três lotes de MR contendo oxitetraciclina em leite, obtiveram dois lotes com 100% e um com 97,4% de vácuo. Em um estudo mais atual, Vieira *et al.* (2012) produziram nove lotes de MR em carne bovina com média de 94,2% de frascos com vácuo.

Os resultados obtidos indicam que o processo de liofilização foi eficiente para o uso pretendido, uma vez que mais de 90% dos frascos dos lotes produzidos apresentaram vácuo.

Avaliação da homogeneidade dos materiais de referência

Os resultados das contagens do teste da homogeneidade dos lotes STA01 e LIST01 estão descritos na Tabela 2.

Excelente durabilidade
e reprodutibilidade,
menores custos
e maior rendimento.



**Colunas UHPLC e HPLC,
semi-preparativas e preparativas.
Fase estacionária em Bulk.**

Mais de 30 diferentes fases
estacionárias – 20 diferentes fases reversas

Troca iônica (IEX) para análises de peptídeos,
proteínas, oligonucleotídeos, DNA e mAb

Exclusão por tamanho (SEC)

Fluido Supercrítico (SFC)

DISTRIBUIÇÃO

TediaBrasil

www.tediabrazil.com.br

YMC
AMERICA, INC.

www.ymcamerica.com

Tabela 2. Resultados do teste da homogeneidade dos lotes STA01 e LIST011, obtidos em UFC/mL e convertidos em Log_{10}

Frasco	STA01			LIST01		
	Replicata 1	Replicata 2	Média	Replicata 1	Replicata 2	Média
1	5,497	5,412	5,454	4,881	4,785	4,833
2	5,346	5,301	5,324	4,771	4,708	4,739
3	5,378	5,511	5,444	5,013	4,919	4,966
4	5,513	5,458	5,486	4,792	5,072	4,932
5	5,408	5,386	5,397	4,756	4,978	4,867
6	5,430	5,391	5,410	4,580	4,892	4,736
7	5,415	5,436	5,426	4,813	4,690	4,752
8	5,442	5,459	5,451	5,097	5,238	5,167
9	5,423	5,449	5,436	4,699	4,813	4,756
10	5,408	5,301	5,355	4,716	4,690	4,703

A avaliação estatística do teste da homogeneidade dos lotes STA01 e LIST01 pode ser visualizada na Tabela 3. Ambos os lotes não apresentaram valores aberrantes (*outliers*) e foram considerados suficientemente homogêneos com desvio-padrão alvo (σ_p) atribuído de 0,10, pois atenderam os critérios da verificação da precisão da homogeneidade do Protocolo Harmonizado, cuja variância entre as amostras deve ser menor que o valor crítico 'c' (THOMPSON *et al.*, 2006) e da norma ISO 13528 que estabelece um desvio-padrão entre-amostras $\leq 3,0$ (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005).

Tabela 3. Avaliação da homogeneidade dos lotes STA01 e LIST01 segundo o Protocolo Harmonizado e a norma ISO 13528

Lote	Protocolo Harmonizado		ISO 13528	
	STA01	LIST01	STA01	LIST01
Desvio-padrão alvo (σ_p)	0,10	0,10	0,10	0,10
Variância entre as amostras	0,0013	0,013	- ^a	-
Valor crítico 'c'	0,0039	0,017	-	-
Desvio-padrão entre amostras	-	-	0,069	0,20
Resultado	Suficientemente Homogêneo	Suficientemente Homogêneo	Suficientemente Homogêneo	Suficientemente Homogêneo

^a- não se aplica.

Outros autores já produziram MR homogêneos destinados a ensaios microbiológicos em alimentos utilizando o processo de liofilização. Rosas *et al.* (2010) produziram dois lotes de MR contendo *S. enteritidis* em leite homogêneos de acordo com o Protocolo Harmonizado (THOMPSON *et al.*, 2006) com valores de desvio-padrão alvo de 0,10 e 0,27. Um MR contendo *Citrobacter freundii* em matriz leite, utilizado em EP (FIOCRUZ, 2012),

também foi considerado homogêneo de acordo com o Protocolo Harmonizado com desvio-padrão alvo atribuído de 0,25. Rosas *et al.* (2011) conseguiram quatro lotes de MR contendo *E. coli* em matriz leite, homogêneos de acordo com a ISO 13528. Vieira *et al.* (2012) obtiveram MR homogêneos em matriz carne bovina crua, de acordo com o Protocolo Harmonizado e a ISO 13528, no entanto ao utilizarem carne cozida e enlatada relataram falta de homogeneidade entre os frascos dos lotes.

O parâmetro σ_p descreve a incerteza-padrão que é mais apropriada para a área de aplicação dos resultados da análise, ou em outras palavras, "adequada ao propósito". Ela não é necessariamente próxima da incerteza associada aos resultados relatados, pois essa função é frequentemente considerada uma definição de "adequação aos propósitos" (THOMPSON *et al.*, 2006). O desvio-padrão alvo (σ_p) atribuído neste estudo foi 0,10 log_{10} da concentração de células, que é menor que o adotado por outros provedores nacionais (FIOCRUZ 2012) e internacionais como o *Food Examination Performance Assessment Scheme* (Fepas), que geralmente é de 0,25. Esse resultado indica que os MR produzidos são suficientemente homogêneos e aplicáveis à utilização em EP e a outros fins.

Outros autores utilizaram diferentes técnicas para produção de MR, como o *spray-dryer*, no entanto a comparação dos resultados obtidos foi dificultada pela diversidade de testes estatísticos utilizados na avaliação dos resultados. Schulten *et al.* (2001) produziram um MR homogêneo contendo *Salmonella* Typhimurium em cápsulas de leite em pó avaliado pela distribuição de "Poisson". In't Veld *et al.* (1995, 1999) produziram lotes de MR para enumeração de *L. monocytogenes* e de *B. cereus* homogêneos de acordo com o mesmo teste supracitado.

A concentração de células inoculadas nos frascos do lote STA01 e LIST01 foram de 6,264 e 5,961 log_{10} UFC/mL, e a *média das contagens do ensaio de homogeneidade* de 5,418 e 4,845 log_{10} UFC/mL, respectivamente. O lote STA01 apresentou uma perda de viabilidade de 0,846 log_{10} (13,5%) após o processo de congelamento e liofilização, enquanto que o lote LIST01 apresentou uma perda maior, com 1,116 log_{10} (18,7%). A sensibilidade ao procedimento de congelamento e liofilização varia de acordo com a espécie bacteriana e a cepa (PETERZ & STENERYD, 1993). O conhecimento da concentração de cada cepa após o processo de congelamento e liofilização é importante para que o laboratório produtor considere esse fator no momento do planejamento experimental para obtenção do MR com a concentração alvo desejada. A diferença da estabilidade entre as cepas observada neste estudo, pode estar associada à maior resistência do gênero *Staphylococcus* aos processos de congelamento e liofilização em comparação ao gênero *Listeria*.

Estudo da estabilidade dos materiais de referência

Os resultados das médias das contagens dos seis frascos utilizados no estudo da estabilidade em longa duração na temperatura de -70°C dos lotes STA01 e LIST01 estão descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. O tempo "zero" foi considerado como a média das contagens do teste de homogeneidade.

Tabela 4. Resultados do estudo da estabilidade em longa duração do lote STA01, obtidos em UFC/mL e convertidos em Log₁₀

Tempo (dias)	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Média
0 ^a	-	-	-	-	-	-	5,418
21	5,217	5,094	5,242	5,414	5,113	5,439	5,253
87	5,271	5,022	5,447	5,288	5,311	5,290	5,270
115	5,346	5,477	5,533	5,336	5,457	5,409	5,426
158	5,339	5,120	5,172	5,059	5,166	5,010	5,144
182	5,318	5,454	5,378	5,305	5,337	5,371	5,360
200	5,439	5,397	5,230	5,276	5,326	5,176	5,319
212	5,097	5,317	5,248	5,284	5,280	5,377	5,267

^a- Valor referente ao log₁₀ da média das contagens do número de UFC/mL dos 10 frascos utilizados no ensaio de homogeneidade.

Tabela 5. Resultados do estudo da estabilidade em longa duração do lote LIST01, obtidos em UFC/mL e convertidos em Log₁₀

Tempo (dias)	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Média
0 ^a	-	-	-	-	-	-	4,878
15	4,677	4,613	4,634	4,684	4,574	4,760	4,657
58	4,637	4,703	4,648	4,904	4,525	4,447	4,644
104	4,602	4,532	4,633	4,661	4,301	4,350	4,532
128	4,648	4,524	4,462	4,592	4,599	4,605	4,572
171	4,836	4,759	4,652	4,641	4,652	4,769	4,718
197	4,774	4,736	4,759	4,872	4,740	4,703	4,764
225	4,839	4,827	4,857	4,844	4,498	4,752	4,769
239	4,665	4,718	4,483	4,760	4,538	4,562	4,621

^a- Valor referente ao log₁₀ da média das contagens do número de UFC/mL dos 10 frascos utilizados no ensaio de homogeneidade.

Os dois lotes de MR foram considerados estáveis durante o período avaliado, de acordo com a ISO GUIDE 35 (2006). O intervalo de confiança a 95% abrange o valor “zero”, conforme visualizado na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação da estabilidade em longa duração dos lotes STA01/11 e LIST01/11, segundo a ISO GUIDE 35

Lote	STA01	LIST01
Coefficiente Angular	-0,00029	-0,000047
Limite Inferior (95%)	-0,0014	-0,0011
Limite Superior (95%)	0,00084	0,00098
Resultado	Estável	Estável

Outros autores também obtiveram resultados satisfatórios na produção de MR estáveis à temperatura de -70°C em matriz leite. Rosas *et al.* (2011) produziram lotes de MR contendo *E. coli* em matriz leite, utilizando o processo de liofilização, estáveis durante quatro meses. Schulten *et al.* (2001) produziram um MR contendo *S. Typhimurium* em leite em pó, pela técnica

de *spray-dryer*, estável durante dois anos a -70°C. Na produção de MR em outras matrizes, pelo processo de liofilização, Vieira *et al.* (21) produziram um MR homogêneo contendo *S. Enteritidis* em carne crua, mas não estável após 3 meses de armazenamento à temperatura de -70 °C. No estudo da estabilidade de MR estocados a temperaturas mais elevadas, produzidos pelo processo de liofilização, Rosas *et al.* (2011) observaram que o armazenamento por longos períodos a temperatura de -20°C pode comprometer a estabilidade dos MR. Estes autores produziram dois lotes de MR contendo *S. Enteritidis* em leite, estáveis pelo período de 3 meses, mas com tendência de decréscimo da concentração de células ao longo do tempo. Após um ano, esses MR não se encontravam mais estáveis. Essa observação pode estar associada ao fato das bactérias Gram-negativas, apresentarem, em geral, uma maior taxa de declínio que as bactérias Gram-positivas (4,20). In't Veld *et al.* (36,37) produziram dois MR em leite contendo, separadamente, *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus* pela técnica de *spray-dryer*. Esses autores relataram que os materiais produzidos não apresentaram decréscimo do número de células quando estocados a -20°C durante os períodos de dois e quatro anos, respectivamente. Nesses casos, a estabilidade desses materiais pode ser atribuída ao uso da técnica de *spray-dryer* ou à natureza da parede bacteriana das espécies estudadas (Gram-positivas).

Os lotes produzidos apresentaram valor em módulo do coeficiente angular baixo, demonstrando pouca variação da concentração celular no período estudado, com perspectiva de serem estáveis nesta condição por um período muito mais longo. O lote STA01 apresentou maior valor em módulo do coeficiente angular que o lote LIST01 (Tabela 6). Essa variação pode ser melhor visualizada na Figura 2, que apresenta o gráfico da estabilidade em longa duração dos lotes de MR produzidos. Esse resultado indica que o lote contendo *L. innocua* liofilizada na matriz leite apresenta menor redução da concentração celular estocada na temperatura de -70°C que o lote STA01.

Os bons resultados obtidos nos estudos da estabilidade podem estar associados ao uso da sacarose como crioprotetor, proporcionando assim maior estabilidade aos micro-organismos na matriz. Em um estudo comparativo do uso de

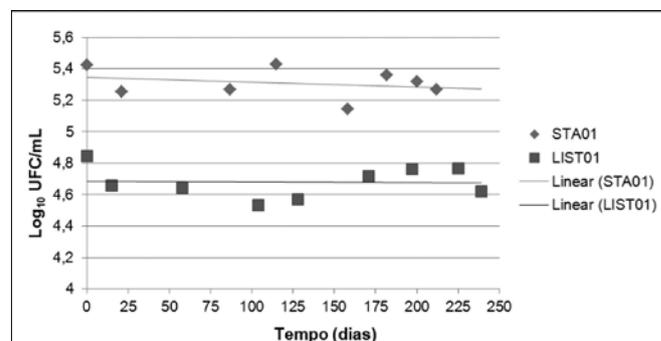


Figura 2. Gráfico da estabilidade em longa duração dos lotes STA01 e LIST01 estocados à -70°C. y = concentração de células (Log₁₀ UFC/mL), x = tempo decorrido (dias), linha de tendência (Regressão linear). (◆) Lote STA01, (■) Lote LIST01

diferentes crioprotetores na produção de MR contendo *E. coli* em matriz leite, os lotes produzidos com sacarose e trealose foram os que apresentaram melhores resultados nos estudos da estabilidade (ROSAS *et al*, 2011).

CONCLUSÃO

A técnica de liofilização e o uso da sacarose como crioprotetor foram adequados para a produção dos MR contendo *S. aureus* e *L. innocua* em matriz leite. A temperatura de -70°C foi adequada para manutenção da concentração celular dos MR produzidos durante todo o período estudado. A partir dos bons resultados obtidos na produção de MR homogêneos e

estáveis em matriz leite, será estudada a aplicabilidade desta metodologia para produção de MR em outras matrizes alimentícias, com o uso de outros micro-organismos contemplados nos parâmetros legais para posterior disponibilização em ensaios de proficiência.

AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão de bolsa. Ao Laboratório de Zoonoses bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz pela sorotipificação da cepa de *Listeria innocua*. Ao INCQS pelos recursos físicos e financeiros.

REFERÊNCIAS

- OBERTS, D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v.50, n.1, p.55-65, 1999.
- CAMARGO, T.S.P. *Proposta de Integração das Normas ISO/IEC 17025 e BPL a um Software de Gerenciamento e Controle Laboratorial*. 2006. 16 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Produção e Gestão) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, 2006.
- PIZZOLATO, M.; TEN CATEN, C. S.; JORNADA, J. A. H. A influência do sistema de gestão de laboratórios nos resultados dos ensaios de proficiência da construção civil. *Gestão & Produção*, São Carlos, v.15, n.3, p.579-589, set-dez. 2008.
- PETERZ, M.; STENERYD, A. C. Freeze-dried mixed cultures as reference samples in quantitative and qualitative microbiological examinations of food. *Journal of Applied Bacteriology*, v.74, p.143-148, 1993.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Relatório final do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos -1º Rodada –Pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos. *Relatório Final – Nº 003/2011*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2011. 20p. Disponível em: < http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=72>. Acesso em: 3 jan. 2012.
- AUGUSTIN, J. C.; CARLIER, V. French laboratory proficiency testing program for food microbiology. *Journal of AOAC International*, v.85, n.4, p.952-959, jul-aug. 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR ISO/GUIA 30 - Termos e definições relacionados com materiais de referência*. Rio de Janeiro, 2000. 6 p.
- 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.
- 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.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO GUIDE 35: Reference materials – General and statistical principles for certification*. Geneva, 2006. 62 p.
- HAYES, D. Quality assurance in the microbiology laboratory. *Accreditation and Quality Assurance*, v.1, n.1, p.18-23, 1996.
- IN'T VELD, P. H. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, p.35-41, 1998.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. II Oficina Sobre Ensaio de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil, Rio de Janeiro 15 a 16 de abril de 2008. *Relatório*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008. 15p.
- MONTEIRO, M. A. *Produção de material de referência de oxitetraciclina em leite*. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.
- FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS. Propostas Qualificadas – Resultado da Chamada Pública MCT/FINEP/Ação Transversal - TIB – 06/2005 – LINHAS 1, 2 e 3. Disponível em:< http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/acao_transversal/acao_transversal_resultado.asp?codFundo=17> Acesso em: 3 jan. 2012.
- 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.



Inovação Tecnológica é Nosso Compromisso

ANALISADOR ELEMENTAR

- **Análise Elementar Baixo ppb em Amostras Sólidas, líquidas e gasosas**
 - Enxofre (inferiores a 5 ppb.)
 - Nitrogênio
 - Cloro
 - Halogênios Orgânicos Totais (TOX)
 - Halogênios Orgânicos Absorvíveis (AOX)
- **Aplicáveis às indústrias de: Polímeros, Eletrônicos, Petróleo e derivados, Borrachas, Ambiental, Gás Liquefeito de Petróleo, Química, etc**
- **Preparação automática de amostra para IC para análise de S, F, CL, Br!**
- **Prepara amostras sólidas, líquidas e gasosas e injeta automaticamente no Cromatógrafo iônico!**
- **Análise de Carbono Orgânico Total (TOC) opcional**



NSX2100



DETERMINADOR DE UMIDADE.



CA-200



- **Sistema de Medição de Umidade Universal com Evaporador para Polímeros, Borrachas Alimentos, Fármacos Sais Inorgânicos, Pós e Líquidos da Mitsubishi Chemical Analytech**
- **Faixa de medição de 10 ppm a 100% de água, titulação potenciométrica e coulometria de forma simultânea**
- **Contém monitor de 5,7 polegadas colorido integrado à face do equipamento**
- **Acoplamento com diversos tipos de fornos evaporadores até 1000°C**
- **Completa automação como opcional**



REFERÊNCIAS

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.835-847, 2004.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, v.46, p.205-229, 2003.

ROSAS, C. O.; BRICIO, S. M. L.; MEDEIROS, V. M.; BRANDAO, M. L. L.; COSTA, J. C. B. Estudo de Crioprotetores na Produção de Material de Referência para Enumeração de Coliformes a 45°C em Matriz Leite em Pó. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 26., 2011, Foz do Iguaçu – Paraná. 2011. *Anais do 26° CMB 2011*. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R0753-2.html>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

WESSMAN, P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V.; HAKANSSON, S. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *Journal of Scientific Food Agricultural*, v.91, p.2518-2528, 2011.

VEIRA, L. R.; ROSAS, C. O.; BRANDAO, M. L. L.; MEDEIROS, V. M.; COSTA, J. C. B.; BRICIO, S. M. L. Desenvolvimento de Metodologia para a Produção de Material de Referência em Matriz de Carne Bovina para Detecção de *Salmonella* spp. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS E CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 17., 3., 2011, Cuiabá – Mato Grosso. 2011. *Anais do 17° ENAAL e 3° Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos 2011*. Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2011. Disponível em: <<http://www.idacta.net/io/resumos/enaal2011/default.asp?action=aprovados&busca.asp?tit=busca>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

BRASIL. Resolução RDC nº12, 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*, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária - Dezembro de 2011. Editoração: SANTOS, A. H. G. S. 27p, Dez. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201103_publ_completa.pdf>. Acesso em: 9 fev. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar – UHA, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª Edição. Washington: American Public Health Association, 2001. Chapter 39, p.387-403.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. *Staphylococcus aureus*. In: _____. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3. Edição. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p. Cap. 10. p.137-148.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2002. 182p.

HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRAGACCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. *Toxinis*, v.1, n.8, p.2106-2116, aug. 2010.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª Edição. Washington: American Public Health Association, 2001. Chapter 36, p.343-356.

JAY, J. M. Listeioses de Origem Alimentar. In: _____. *Microbiologia de alimentos*. 6ª Edição. Porto Alegre: Artemd, 2005. 711p. Cap. 25. p.517-542.

NEWLL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFFALL, J.; SCHEUTZ, F.; GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, supplement, p.S13-S15, maio 2010.

HITCHINS, A. D.; JINNEMAN, K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: *Bacteriological analytical manual: Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes*. 8ª Edition. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 10, april 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*. Switzerland, 2005. 66 p.

ROSAS, C. O.; BRANDAO, M. L. L.; BRICIO, S. M. L.; MEDEIROS, V. 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. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.69, n.1, p.15-22, 2010.

SHULTEN, S. M.; IN'T VELD, P. H.; GHAMESHLOU, Z.; SCHIMMEL, H.; LINSINGER, T. *The Certification of the Number of Colony Forming Particles of Salmonella typhimurium and Number Fraction of Negative Capsules from Artificially Contaminated Milk Powder: CRM 507R*. Belgium: European Commission, 2001. 74p. ISBN 92-828-991-8. Disponível em: <<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/4261>>. Acesso em: 11 jan. 2012.

IN'T VELD, P. H.; NOTERMANS, S. H. W.; VAN DER BERG, M. Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors; a collaborative study. *Food Microbiology*, v.12, p.125-134, 1995.

IN'T VELD, P. H.; HAVELAAR, A. H.; VAN STRIJP-LOCKEFEEER, N. G. W. M. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. *Journal Applied Microbiology*, v.86, p.266-274, 1999.