

**Produção de Materiais de Referência para Ensaio de Proficiência  
em Microbiologia de Alimentos**

**CARLA DE OLIVEIRA ROSAS**

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.  
Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Paola Cardarelli-Leite

Rio de Janeiro

2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Produção de Materiais de Referência para Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos

Autor: Carla de Oliveira Rosas

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

---

Profa. Manuela da Silva  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Prof. Marcus Henrique Campino de La Cruz  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Prof. Marco Antônio Lemos Miguel  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientadora: \_\_\_\_\_

Profa. Paola Cardarelli-Leite  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rosas, Carla de Oliveira

Produção de materiais de referência para ensaios de proficiência em microbiologia de alimentos/Carla de Oliveira Rosas. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xvi, 112p., il., tab.

Dissertação (Mestrado). – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Paola Cardarelli-Leite

1.Ensaio de Proficiência. 2.Material de Referência. 3. Microbiologia de Alimentos. I.Título.

Production of reference materials for proficiency tests  
in food microbiology

*Aos meus amores  
Giovanna e João Lucas*

## AGRADECIMENTOS

Ao INCQS na gestão do diretor Dr. André Gemal e da chefe de departamento Dra. Célia Romão pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

A Dr. Paola Cardarelli-Leite pela orientação e confiança durante a realização desta dissertação.

A Márcia Warnken, Valéria Medeiros e a Aline Souza, pela amizade e compreensão em todos os momentos deste trabalho. Agradeço em especial a Marcelo Brandão e a Silvia Bricio pela valiosa participação nas etapas de elaboração, execução e finalização do projeto.

As colegas do Laboratório de Bactérias e Fungos de Referências e dos Setores de Saneantes e Identificação Bacteriana do Departamento de Microbiologia do INCQS pela disponibilização dos equipamentos utilizados neste estudo.

Aos colegas que compõem as equipes da Central de Esterilização e do Setor de Meios de Cultura meu muito obrigada, pelo esforço em atender aos constantes serviços solicitados, sempre com muita atenção e carinho.

Ao colega Vicente Lemos pela idealização e confecção das estantes de PVC utilizadas durante os procedimentos de preparo dos materiais.

A Janete Duarte pelo esforço na obtenção dos frascos, rolhas e tampas de metal junto a BIOMANGUINHOS.

A Sinéa de Andrade e ao Diego Cavatti do Laboratório de Biologia e Artigos de Saúde pelo grande auxílio nas análises de umidade residual.

A professora Maria da Conceição Viana e a amiga Cláudia Maria pelas importantes sugestões dadas ao projeto, durante as aulas de “Metodologia de Pesquisa”.

A professora Dra. Manuela da Silva pela revisão da dissertação e pela dedicação ao Programa de Pós-Graduação.

À Dra. Maria Helena Wholers e ao prof. Sérgio Alves da Silva pela orientação na utilização dos cálculos estatísticos.

As amigas do curso de pós-graduação Samara, Mariana Tavares e Érica pelos momentos de alegria durante as disciplinas assistidas.

A Danielle Rosas, querida irmã, pelo incentivo e apoio irrestrito durante a finalização deste trabalho.

A minha mãe Ariete pelo carinho permanente e pela constante ajuda nas tarefas diárias.

Ao Afonso César, pelo amor, incentivo e pelo esforço de fazer papel de pai e mãe com a Giovanna nos meus momentos de ausência.

E a todas as outras pessoas: professores, amigos e familiares que de perto ou de longe, direta ou indiretamente participaram na realização deste trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO

No Brasil é restrita a oferta de ensaios de proficiência (EP) na área de microbiologia de alimentos. Além disso, os altos custos diminuem a participação regular de laboratórios públicos e privados nesses ensaios. É de grande importância o incentivo da participação de laboratórios brasileiros em EP. Os materiais de referência (MR) utilizados para essa proposta devem apresentar características de homogeneidade e estabilidade que assegurem a distribuição de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão. A produção de MR destinados a ensaios microbiológicos é dificultada pela instabilidade natural dos microrganismos. O presente estudo avaliou a técnica de liofilização no preparo de MR para EP nos ensaios de “detecção de *Salmonella* sp.” e “enumeração de *B. cereus*” em leite. Foram preparados lotes de materiais contendo apenas um microrganismo e lotes mistos contendo *Salmonella* sp. e *B. cereus* em uma mesma matriz. Foram determinadas as concentrações de inóculo utilizadas no preparo dos diferentes lotes de MR e padronizados os procedimentos de contaminação da matriz. Para monitorar a qualidade dos materiais produzidos foram estabelecidos ensaios de controle, dentre eles o teste da homogeneidade e da estabilidade em longo e curto prazo. A técnica de liofilização se mostrou adequada como processo de dessecação para os MR produzidos. Os microrganismos se mantiveram estáveis à temperatura de estoque de -20°C, no entanto, apresentaram perdas de viabilidade, quando estocados a temperaturas de 25°C e 35°C. Das bactérias estudadas *B. cereus* apresentou, em média, maior resistência às condições de dessecação. A padronização da técnica de produção desses MR propiciará a geração de materiais na área de microbiologia de alimentos, que poderão ser utilizados em futuros EP, com custos de participação mais acessíveis aos laboratórios nacionais.

Palavras chave: ensaio de proficiência – materiais de referência – microbiologia de alimentos

## ABSTRACT

The provision of proficiency testing (PT) is restricted in the area of food microbiology, in Brazil. Furthermore, high costs reduce the regular participation of public and private laboratories in these tests. It is of great importance to encourage Brazilian laboratories to participate in PT. The reference materials (RM) to be used for this should present characteristics of homogeneity and stability to ensure the distribution of units with similar properties, close to a standard pattern. The production of RM for microbiological testing is hampered by the instability of natural microorganisms. This study evaluated the technique of freeze drying in the preparation of RM for the PT schemes for detection of *Salmonella* sp. and enumeration of *B. cereus* in milk. Batches of materials containing only one microorganism and mixed batches containing *Salmonella* sp. and *B. cereus* in the same matrix were prepared. Concentrations of inoculum used in the preparation of different batches of RM were measured and procedures for matrix contamination were standardized. Trials of control were established to monitor the quality of materials produced, among them the test of homogeneity and stability at long and short term. The technique of freeze drying proved suitable as a process of desiccation for the RM produced. The microorganisms were kept stable at a stock temperature of -20°C, however, when stored at 25 ° C and 35 C, showed loss of viability. From the bacteria studied *B. cereus* showed, on the average, to be more resistant to the conditions of desiccation. The standardized production of these materials will help the generation of RM in food microbiology, which may be used in future PT, with more accessible costs for participation of national laboratories.

Keywords: proficiency testing - reference materials – food microbiology



## LISTA DE SIGLAS:

Aa – Atividade de água  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC – Association of Official Analytical Chemists  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*  
CONASS – Conselho Nacional de Secretários de Saúde  
CONASEMS - Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde  
COVEH - Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar  
DM – Departamento de Microbiologia  
DTA - Doenças de Transmissão Alimentar  
EC - *European Commission*  
EP – Ensaio de proficiência  
FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
IRMM - *Institute for Reference Materials and Measurements*  
ISO – *International Organization for Standardization*  
ISO REMCO - *Council Committee on Reference Materials of the International Organization for Standardization*  
GGLAS – Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública  
LACEN – Laboratórios Centrais de Saúde Pública  
LMD – Limite Mínimo de Detecção  
LMR - Laboratório de Microrganismos de Referência  
LPAC - Leite em pó altamente contaminado  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MCT - Ministério de Ciência e Tecnologia  
MR – Material de referência  
MRC - Material de referência certificado  
MS – Ministério da Saúde  
PHLS - *Public Health Laboratory Service*  
RAEMA - *Réseau d' Analyses et d' Echanges en Microbiologie des Aliments*  
RIVM - *National Institute of Public Health and Environmental Protection*  
SE - *Salmonella* Enteritidis  
SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária  
UFC- Unidades Formadoras de Colônias  
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro  
UHT – Ultra High Temperature  
VISAS - Centros de Vigilância Sanitária

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Valores dos fatores F1 e F2 para uso no ensaio de homogeneidade, de acordo com o número de unidades analisadas .....	7
Quadro 2. Comportamento bioquímico de <i>Salmonella sp.</i> e <i>C.freundii</i> nos meios TSI, LIA e características do crescimento colonial em ágar Entérico Hektoen .....	37
Quadro 3. Comportamento de <i>B. cereus</i> nas provas bioquímicas .....	37
Tabela 1. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de <i>Salmonella sp.</i> (analitos contendo <i>Salmonella sp.</i> ).....	41
Tabela 2. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de <i>Salmonella sp.</i> (analitos contendo <i>C. freundii</i> ).....	42
Tabela 3. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de <i>B. cereus</i> .....	42
Tabela 4. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR mistos, destinados ao ensaio de detecção de <i>Salmonella sp.</i> e ao ensaio de enumeração de <i>B. cereus</i> .....	43
Tabela 5. Resultados da avaliação da equivalência entre os lotes realizada através do Teste t, com nível de significância de 5%.....	43
Tabela 6. Percentual de frascos que apresentaram resultado satisfatório na leitura do vácuo após o processo de liofilização .....	44
Tabela 7. Avaliação do resultado da umidade residual dos lotes liofilizados analisados, segundo recomendações do FDA (1990).....	45
Tabela 8. Resultado da contagem do Lote S1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	46
Tabela 9. Resultado da contagem do Lote S2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	47
Tabela 10. Resultado da contagem do Lote S3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	47
Tabela 11. Resultado da contagem do Lote S4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	48
Tabela 12. Resultado da contagem do Lote C1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	48

Tabela 13. Resultado da contagem do Lote C2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	49
Tabela 14. Resultado da contagem do Lote C3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	49
Tabela 15. Resultado da contagem do Lote C4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	50
Tabela 16. Resultado da contagem do Lote BC1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	50
Tabela 17. Resultado da contagem do Lote BC2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	51
Tabela 18. Resultado da contagem do Lote BC3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	51
Tabela 19. Resultado da contagem do Lote BC4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	52
Tabela 20. Resultado da contagem do Lote SB1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	53
Tabela 21. Resultado da contagem do Lote SB2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	54
Tabela 22. Resultado da contagem do Lote SB3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	55
Tabela 23. Resultado da contagem do Lote SB4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade....	56
Tabela 24. Estabilidade em longo prazo do Lote S2. ....	58
Tabela 25. Estabilidade em longo prazo do Lote S3. ....	58
Tabela 26. Estabilidade em longo prazo do Lote S4. ....	59
Tabela 27. Estabilidade em longo prazo do Lote C1. ....	60
Tabela 28. Estabilidade em longo prazo do Lote C2. ....	61
Tabela 29. Estabilidade em longo prazo do Lote C3. ....	62
Tabela 30. Estabilidade em longo prazo do Lote C4. ....	63
Tabela 31. Estabilidade em longo prazo do Lote BC1. ....	64
Tabela 32. Estabilidade em longo prazo do Lote BC2. ....	65
Tabela 33. Estabilidade em longo prazo (estoque) do Lote BC3. ....	66
Tabela 34. Estabilidade em longo prazo do Lote SB1. ....	67
Tabela 35. Estabilidade em longo prazo do Lote SB2. ....	68

Tabela 36. Estabilidade em longo prazo do Lote SB3.....	69
Tabela 37. Estabilidade em longo prazo do Lote SB4.....	70
Tabela 38. Estabilidade em curto prazo do Lote S2.....	72
Tabela 39. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote S3 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	73
Tabela 40. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote S4 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	74
Tabela 41. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C1 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	75
Tabela 42. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C2 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	76
Tabela 43. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C3 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	77
Tabela 44. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C4 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	78
Tabela 45. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC1 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	79
Tabela 46. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC2 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	80
Tabela 47. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC3 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	81
Tabela 48. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB1 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	82
Tabela 49. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB2 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	83
Tabela 50. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB3 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	84
Tabela 51. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB4 em duas diferentes temperaturas de transporte. ....	85
Tabela 52. Percentuais do $\log_{10}$ das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em longo prazo.....	86
Tabela 53. Percentuais do $\log_{10}$ das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em curto prazo a 25°C.....	87

Tabela 54. Percentuais do $\log_{10}$ das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em curto prazo a 35°C.....	87
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variação da concentração de células do lote S2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	58
Figura 2. Variação da concentração de células do lote S3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	59
Figura 3. Variação da concentração de células do lote S4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	59
Figura 4. Variação da concentração de células do lote C1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	60
Figura 5. Variação da concentração de células do lote C2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	61
Figura 6. Variação da concentração de células do lote C3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	62
Figura 7. Variação da concentração de células do lote C4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	63
Figura 8. Variação da concentração de células do lote BC1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	64
Figura 9. Variação da concentração de células do lote BC2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	65
Figura 10. Variação da concentração de células do lote BC3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	66

Figura 11. Variação da concentração de células de <i>Salmonella</i> sp. e de <i>B. cereus</i> do lote SB1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	67
Figura 12. Variação da concentração de células de <i>Salmonella</i> sp. e de <i>B. cereus</i> do lote SB2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	68
Figura 13. Variação da concentração de células de <i>Salmonella</i> sp. e de <i>B. cereus</i> do lote SB3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	69
Figura 14. Variação da concentração de células de <i>Salmonella</i> sp. e de <i>B. cereus</i> do lote SB4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses). .....	70
Figura 15. Variação da concentração diária de células do lote S2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	72
Figura 16. Variação da concentração diária de células do lote S3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	73
Figura 17. Variação da concentração diária de células do lote S4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	74
Figura 18. Variação da concentração diária de células do lote C1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	75
Figura 19. Variação da concentração diária de células do lote C2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	76
Figura 20. Variação da concentração diária de células do lote C3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	77
Figura 21. Variação da concentração diária de células do lote C4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias). .....	78

Figura 22. Variação da concentração diária de células do lote BC1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).....	79
Figura 23. Variação da concentração diária de células do lote BC2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).....	80
Figura 24. Variação da concentração diária de células do lote BC3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).....	81
Figura 25. Variação da concentração diária de células do lote SB1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – <i>Salmonella</i> sp. B – <i>B. cereus</i> . y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias)..	82
Figura 26. Variação da concentração diária de células do lote SB2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – <i>Salmonella</i> sp.. B – <i>B. cereus</i> . y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias)..	83
Figura 27. Variação da concentração diária de células do lote SB3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – <i>Salmonella</i> sp. B – <i>B. cereus</i> . y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias)..	84
Figura 28. Variação da concentração diária de células do lote SB4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – <i>Salmonella</i> sp.. B – <i>B. cereus</i> . y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias)..	85
Figura 29. Percentual de perda de $\log_{10}$ das médias de contagem em UFC/mL de <i>Salmonella</i> spp, <i>C. freundii</i> e <i>B. cereus</i> , durante o estudo de estabilidade em longo prazo. ....	86
Figura 30. Percentual de perda de $\log_{10}$ das médias de contagem em UFC/mL de <i>Salmonella</i> spp, <i>C. freundii</i> e <i>B. cereus</i> , durante o estudo de estabilidade em curto prazo à temperatura de 25°C. ....	87
Figura 31. Percentual de perda de $\log_{10}$ das médias de contagem em UFC/mL de <i>Salmonella</i> spp, <i>C. freundii</i> e <i>B. cereus</i> , durante o estudo de estabilidade em curto prazo à temperatura de 35°C. ....	88



## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A Vigilância sanitária e os laboratórios oficiais de controle de qualidade.....	1
1.2. Importância da implantação de sistemas da qualidade em laboratórios analíticos .....	2
1.3. Ensaio de proficiência.....	3
1.4. Materiais de referência .....	4
1.4.1. Estudo da Homogeneidade .....	5
1.4.2. Estudo da Estabilidade.....	8
1.5. Considerações gerais para materiais de referência utilizados em microbiologia de alimentos .....	9
1.6. Matrizes utilizadas no preparo de MR em microbiologia de alimentos.....	11
1.7. Padrões microbiológicos para o controle microbiológico do leite em pó .....	12
1.7.1. Gênero <i>Salmonella</i> .....	12
1.7.2. <i>Bacillus cereus</i> .....	16
1.8. Métodos de preservação de microrganismos.....	18
1.9. Técnicas de produção e manutenção de materiais de referência para microbiologia de alimentos .....	20
2.0. Disponibilidade de ensaios de proficiência no Brasil e no exterior .....	23
2.1. Relevância do projeto.....	24
3. Objetivos .....	25
3.1. Objetivo Central.....	25
3.2. Objetivos Específicos .....	25
4. Material e Métodos .....	26
4.1. Local de desenvolvimento do estudo .....	26
4.2. Procedimentos de preparo dos MR para ensaio de detecção de <i>Salmonella</i> (analitos contaminados com <i>Salmonella sp.</i> e analitos contaminados com <i>Citrobacter freundii</i> ) e MR para ensaio de enumeração de <i>B. cereus</i> .....	26
4.2.1. Seleção e confirmação do perfil bioquímico das bactérias selecionadas ..	27
4.2.2. Preparo das culturas estoque.....	28
4.2.3. Preparo da cultura para uso nos procedimentos de produção dos MR.....	29
4.2.4. Controle da concentração de células .....	29

4.2.5. Procedimentos para a homogeneização da suspensão de células com a solução de leite desnatado a 10%.....	30
4.2.6. Envase, congelamento e liofilização do material.....	31
4.2.7. Ensaio de controle.....	31
4.3. Procedimentos de preparo dos MR mistos para os ensaios de detecção de <i>Salmonella</i> e enumeração de <i>B. cereus</i> em uma mesma matriz de leite em pó.....	38
4.3.1. Seleção e confirmação do perfil bioquímico das bactérias selecionadas..	38
4.3.2. Preparo da cultura estoque.....	38
4.3.3. Preparo da cultura para uso nos procedimentos de produção dos MR.....	38
4.3.4. Controle da concentração de células.....	38
4.3.5. Procedimentos para a homogeneização da suspensão de células com a solução de leite desnatado a 10%.....	39
4.3.6. Envase, congelamento e liofilização do material.....	39
4.3.7. Ensaio de controle.....	39
5. Resultados.....	41
5.1. Resultado da identificação bioquímica utilizando sistema de identificação automatizado VITEK.....	41
5.2. Resultados dos controles dos lotes produzidos.....	41
5.3. Avaliação da equivalência entre os lotes.....	43
5.4. Resultado dos controles dos lotes produzidos.....	44
5.4.1. Verificação do vácuo.....	44
5.4.2. Verificação da pureza.....	44
5.4.3. Determinação da umidade residual.....	45
5.4.4. Verificação da manutenção das características fenotípicas.....	45
5.4.5. Resultados do teste da homogeneidade.....	46
5.4.6. Resultados do teste da estabilidade.....	56
5.13- Resultados do lote SB1.....	82
5.5. Comparação da perda da viabilidade das bactérias estudadas, frente às variações de tempo, nas diferentes temperaturas de estudo.....	86
6. Discussão.....	89
7. CONCLUSÕES.....	97
8. PERSPECTIVAS.....	98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
Anexo 1. Meios de Cultura.....	112

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A Vigilância sanitária e os laboratórios oficiais de controle de qualidade**

A constante utilização de novas tecnologias de produção, aliada à circulação mundial de produtos e aos avanços científicos, trouxeram inquestionáveis benefícios para a vida da sociedade moderna. Entretanto, ampliaram as possibilidades do aparecimento e da distribuição de novos riscos à saúde pública (LUCCHESE, 2001<sub>a</sub>).

É função do Estado a proteção da população por meio de políticas públicas. Neste contexto, as práticas de vigilância sanitária têm adquirido uma crescente relevância na sua área de atuação (SILVEIRA, 2006).

O atual modelo de vigilância sanitária brasileiro, citado na Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 1990), em seu artigo sexto, se encontra descrito como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, circulação de bens e serviços de interesse da saúde pública.

Para o cumprimento de suas ações o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) utiliza diferentes práticas e instrumentos de intervenção e é integrado pelos seguintes órgãos: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que coordena o Sistema; o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS); o Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASEMS); os Conselhos Estaduais, Distrital e Municipais de saúde; os Centros de Vigilância Sanitária Estaduais, Municipais e do Distrito Federal (VISAS); os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (SILVEIRA, 2006).

Para a avaliação analítica de produtos a vigilância sanitária conta com o suporte técnico dos LACEN, distribuídos em todos os estados do território nacional e do INCQS ao nível federal. Esses laboratórios compõem a Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade ligados ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e realizam entre outras atividades, análises laboratoriais em produtos sob apreensão fiscal, verificando o cumprimento das leis e auxiliando nas ações da vigilância sanitária (LUCCHESE, 2001<sub>b</sub>).

## **1.2. Importância da implantação de sistemas da qualidade em laboratórios analíticos**

Nos laboratórios analíticos que tem como objetivo o controle da qualidade de produtos e serviços destinados ao consumo humano, a obtenção de resultados precisos e confiáveis são essenciais para a credibilidade e para a garantia da qualidade das suas funções. Resultados de análises não fidedignos podem gerar problemas de saúde pública, interpretações erradas de processos de produção e perdas econômicas (JANNING et al., 1995).

A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios de ensaio promove melhorias no planejamento, na organização, no registro dos dados e na documentação dos procedimentos empregados, desde a amostragem até a liberação dos resultados (CARDOSO, 2008; HAYES, 1996; ROBERTS, 1999).

O reconhecimento formal da competência técnica de um laboratório de ensaio ao utilizar sistemas da qualidade pode ser obtido através da acreditação realizada por um órgão competente para esta função.

Cabe enfatizar a importância do incentivo à implantação e implementação de sistemas de qualidade nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública do Brasil, que tem como missão estratégica a realização de diagnósticos laboratoriais para os centros de vigilância sanitária.

Segundo Camargo (2006), a NBR ISO/IEC 17025 (2005) tem sido o sistema da qualidade mais reconhecido e utilizado em laboratórios de ensaios analíticos. Esta norma descreve os requisitos que os laboratórios de ensaio e de calibração devem atender para demonstrar sua competência técnica e capacidade de produzir resultados tecnicamente precisos, confiáveis e rastreáveis.

De acordo com relatório divulgado pela Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública (GGLAS) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006), até o ano de 2005, apenas 47,6% dos laboratórios oficiais do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária tinham implantado sistemas da qualidade em suas atividades. Destes, 76% utilizava a NBR ISO/IEC 17025 como guia para essa proposta.

Dentre os requisitos apontados na NBR ISO/IEC 17025 (2005), para o controle da qualidade dos resultados das análises estão: o uso de métodos validados, a utilização de materiais de referência (MR), para o controle laboratorial interno e a

participação periódica do laboratório em programas de ensaios de proficiência (EP) e/ou em comparações interlaboratoriais.

### **1.3. Ensaio de proficiência**

Ensaio de proficiência são descritos por Roberts (1999), como ferramentas de controle de qualidade externa, que possibilitam a avaliação da habilidade de um laboratório em obter resultados precisos. A participação em EP permite a um laboratório a comparação do desempenho obtido, com o de outros laboratórios ao analisarem analitos idênticos, específicos para um parâmetro de ensaio (ROSENGREN & HENERYD, 1998).

Para Leclercq (2006), a participação em ensaios de proficiência, além de possibilitar a avaliação dos procedimentos técnicos de um laboratório, tem também a função de substituir o acompanhamento de ensaios durante uma auditoria de acreditação.

A Norma ILAC G13:08 (2007) em complemento à NBR ISO/IEC GUIA 43-1(1999), fornece os requisitos para o desenvolvimento, a organização e condução de programas de EP.

A logística de um EP consiste no envio simultâneo de analitos com conteúdos desconhecidos e específicos para um tipo de ensaio. Os analitos são provenientes de um mesmo lote de preparo e são selecionados aleatoriamente para serem enviados para um grupo de laboratórios participantes (NBR ISO/IEC GUIA 43-1, 1999). Junto com os materiais são enviadas orientações sobre os cuidados para a manutenção da amostra até a data de análise, dos procedimentos adequados durante o manuseio inicial do material, do método a ser utilizado na análise e sobre os prazos limite para o início da análise e de envio dos resultados.

No final da rodada do ensaio de proficiência, relatórios de análise são emitidos aos participantes com informações importantes acerca do número de laboratórios participantes e relacionadas ao método de análise utilizado por cada laboratório (AUGUSTIN & CARLIER, 2006). Dados sobre as performances dos participantes são descritos de forma confidencial, através da utilização de códigos individuais, que asseguram o anonimato de cada laboratório participante. A NBR ISO/IEC GUIA 43-1(1999) sugere que sejam citados no relatório o modelo estatístico e as técnicas de análise utilizadas no tratamento dos dados.

Até a presente data, ainda não foi acordado internacionalmente um método para a análise estatística de ensaios qualitativos. A maioria dos provedores classifica os resultados qualitativos como corretos, falso positivos ou negativos. Para a verificação da participação em ensaios quantitativos, os organizadores de EP submetem os resultados à análise estatística podendo apresentar os resultados dos participantes em planilhas ou em gráficos ilustrando os desempenhos de cada participante (ROBERTS, 1999).

A proficiência dos laboratórios participantes em ensaios quantitativos pode ser avaliada de diferentes formas. Alguns organizadores utilizam cálculo do Z-scores, como descrito na Norma ISO 13528 (2005).

Participações regulares em programas de EP demonstram o comprometimento do laboratório na melhoria e na manutenção da performance técnica. Os resultados satisfatórios obtidos nesses programas constituem provas valiosas da competência desses laboratórios (ROBERTS, 1999).

A avaliação do desempenho do laboratório e da equipe técnica se dá através da comparação dos resultados obtidos com os de outros laboratórios, conferindo a possibilidade do acompanhamento da evolução analítica do laboratório em diferentes momentos (AUGUSTIN & CARLIER, 2006). Esses resultados podem ainda apontar quedas de desempenho, alertando assim sobre a necessidade da utilização de ações corretivas na rotina de trabalho (DVEYRIN et al., 2001).

#### **1.4. Materiais de referência**

A NBR ISO/GUIA 30 (2000) define material de referência (MR), como um *“Material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores materiais”*. A Norma menciona também material de referência certificado (MRC) como um *“Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedade certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado da sua incerteza para um nível de confiança estabelecido”*. Esta Norma destaca a importância crescente destes materiais em

atividades nacionais e internacionais de normalização, em ensaios de proficiência e no credenciamento de laboratórios.

As definições de MR e MRC se encontram em processo de revisão, tendo sido recentemente aprovada pelo *Comitê sobre Material de Referência da Organização Internacional de Padronização – ISO REMCO*. Dentre as novas terminologias a serem adotadas, destaca-se a indicação do uso de um MR para apenas uma finalidade em um sistema de medição, ou seja, como calibrador ou como controle de qualidade (EMONS et al., 2006).

Quando preparados para serem utilizados em ensaios de proficiência os lotes de MR devem ser suficientemente homogêneos e estáveis, assegurando a distribuição de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão (THOMPSON et al., 2006).

#### 1.4.1. Estudo da Homogeneidade

Materiais preparados para EP e outros estudos interlaboratoriais são geralmente heterogêneos com relação a uma característica, apesar dos esforços aplicados para garantir a homogeneidade durante a produção (THOMPSON et al., 2006).

Segundo orientações das Normas NBR ISO/IEC GUIA 43-1 (1999) e ILAC G13:08 (2007), o controle da homogeneidade deve garantir que os laboratórios participantes de um EP recebam analitos que não apresentem diferenças significativas nos parâmetros a serem medidos.

Para a etapa inicial do teste de homogeneidade a Norma ISO GUIDE 35 (2006) indica a seleção aleatória das unidades a serem avaliadas e a quantidade que deve ser proporcional ao tamanho do lote, no entanto estabelece um número mínimo de dez unidades por lote. A Norma recomenda a utilização de métodos de análise adequados, que permitam a obtenção de resultados precisos. Cada unidade selecionada deve ser analisada duas vezes, sob condições de repetitividade<sup>1</sup>.

Para o teste da homogeneidade, as Normas NBR ISO/IEC GUIA 43-1 (1999), ILAC G13:08 (2007) recomendam a utilização dos procedimentos estatísticos

---

<sup>1</sup> Manutenção das condições de análise, a fim de eliminar possíveis variações no resultado: mesmo laboratório, mesmo analista e no mesmo dia de análise se possível.

descritos por Thompson e colaboradores (2006) no “*International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories*”.

Thompson e colaboradores (2006) recomendam primeiramente a aplicação de um teste para a eliminação de valores dispersos. O teste de Cochran, segundo Lopes (2007), baseia-se na comparação da maior variância encontrada entre todos os resultados do grupo, com a soma de todas as variâncias.

A amplitude de cada conjunto  $i$  de 2 repetições ( $A_i$ ), corresponde ao maior valor encontrado menos o menor valor. Após calculadas, as amplitudes são ordenadas de forma crescente. É determinado o quadrado da amplitude máxima ( $A_{\max}^2$ ) e o somatório de todas as amplitudes ao quadrado  $A_i^2$ . O valor  $C_{\text{calculado}}$  de Cochran é determinado dividindo-se a amplitude máxima ao quadrado, pelo somatório das amplitudes ao quadrado:

$$C_{\text{calculado}} = A_{\max}^2 / \sum A_i^2$$

O valor do  $C_{\text{calculado}}$  é então comparado com o valor tabelado ( $C_{\text{crítico}}$ ) correspondente ao número de amostras analisadas (normalmente se utiliza para 95% de confiança). Se  $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$  os valores são aceitos e o teste termina. Se  $C_{\text{calculado}} > C_{\text{crítico}}$ , a duplicata relativa à amplitude máxima ( $A_{\max}$ ) é considerada dispersa com relação à amplitude entre as amostras. Na ocorrência de valores dispersos deve-se avaliar a possibilidade da eliminação destes resultados, que evidenciam erros de análise.

Após a eliminação dos resultados possivelmente dispersos, THOMPSON e colaboradores (2006) indicam a análise da variância (ANOVA), que consiste em uma ferramenta de análise estatística que avalia possíveis variações na composição das amostras, através da análise de variância simples.

Lopes (2007) descreve que na análise dos dados pela ANOVA, são calculados: a variância analítica ( $S_{\text{an}}^2$ ), que consiste no somatório das amplitudes ao quadrado dividido pelo número de amostras que foram avaliadas multiplicado-se por 2,

$$S_{\text{an}}^2 = \sum A_i^2 / 2n$$

a variância das somas entre as amostras ( $V_s$ ), que corresponde ao somatório entre a soma das duas contagens de cada amostra ( $S_i$ ), menos a média das somas ( $S$  médio) ao quadrado, divididos pelo número de amostras menos 1.

$$V_s = \sum (S_i - S \text{ médio})^2 / (m-1)$$



e as variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ ) que corresponde aos quadrados médios “entre” ( $V_s/2$ ) e “dentro” ( $S_{an}$ ) das amostras analisadas:

$$S_{am}^2 = (V_s / 2 - S_{an}) / 2 , \quad \text{considerar } S_{am}^2 = 0, \text{ se o resultado for negativo.}$$

Um valor menor possível deve ser atribuído ao desvio padrão ( $\sigma_p$ ), que será utilizado para o cálculo do desvio padrão tolerável ( $\sigma_{all}^2$ ):

$$\sigma_{all}^2 = (0,3 \sigma_p)^2$$

O cálculo do “c” crítico é feito a partir do desvio padrão tolerável ( $\sigma_{all}^2$ ), da variância analítica ( $S_{an}^2$ ) e dos valores de  $F_1$  e  $F_2$  apresentados no quadro 1, que variam de acordo com o número de unidades analisadas em duplicata.

$$c = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 S_{an}^2$$

**Quadro 1 – Valores dos fatores F1 e F2 para uso no ensaio de homogeneidade, de acordo com o número de unidades analisadas**

n	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
F <sub>1</sub>	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,79	1,75	1,72	1,69	1,67	1,64	1,62	1,60	1,59
F <sub>2</sub>	1,43	1,25	1,11	1,01	0,93	0,86	0,80	0,75	0,71	0,68	0,64	0,62	0,59	0,57

n – número de amostras analisadas em duplicata

No final da análise, o valor da variância entre as amostras ( $S_{am}^2$ ) deve ser comparado com o valor de “c” crítico. Caso  $S_{am}^2 < c$ , então existirá evidência (com 95% de confiança) que o material pode ser considerado homogêneo. Se  $S_{am}^2 > c$ , então a evidência (com 95% de confiança) que o material pode ser considerado não-homogêneo (LOPES, 2007).

Fearn e Thompson (2001) sugerem a verificação da precisão da homogeneidade, a partir dos valores do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ ) ou  $S_{an}$  e do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ ), que devem obedecer à relação:  $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ .

#### 1.4.2. Estudo da Estabilidade

Tendo em vista as variações que os MR podem sofrer antes de serem analisados, dois tipos de teste de estabilidade devem ser realizados separadamente: o teste de estabilidade em longo prazo, que verifica a estabilidade do material a uma temperatura escolhida que se tenha praticamente certeza da estabilidade do MR e o teste de estabilidade em curto prazo, que avalia a estabilidade do material sob condições ambientais extremas, simulando o processo de distribuição do material. O teste em curto prazo é realizado com a exposição do material a diferentes temperaturas em diferentes intervalos de tempo. É geralmente realizado no período de 1 a 2 meses, entretanto pode ser estendido e determinado simultaneamente com a estabilidade em longo prazo. Os estudos de estabilidade em longo prazo mais demorados ocorrem em média durante 24 a 36 meses, com 5 a 6 pontos de avaliação (ISO GUIDE 35, 2006).

Quando um mesmo lote de material é utilizado em um programa contínuo de ensaio de proficiência, análises de controle da estabilidade do MR estocado devem ser realizadas a cada nova rodada de ensaio (ILAC G13:08/2007).

Para a condução do teste de estabilidade a ISO GUIDE 35 (2006), recomenda a análise dos analitos sob condições de repetitividade utilizando o teste desenvolvido por Lamberty e colaboradores (1998), denominado “*isochronous design*”. A metodologia se baseia no estoque de amostras em diferentes temperaturas por diferentes períodos de tempo, com a realização das análises das diferentes amostras em um mesmo momento. “*Isochronous design*” requer somente condições de repetitividade.

O método “clássico design”, necessita de repetitividade e reprodutividade, com isso, os analitos são analisados em momentos diferentes, podendo assim aumentar as chances de variações nos resultados. O método é recomendado tanto para o teste de estabilidade em curto prazo, como para a estabilidade em longo prazo.

A Norma ILAC G13:08 (2007) recomenda para a avaliação estatística da estabilidade a utilização dos procedimentos de um dos documento citados a seguir: THOMPSON e colaboradores (2006), a Norma ISO 13528 (2005), ou a Norma ISO GUIDE 35 (2006).

Para a avaliação da estabilidade a ISO GUIDE 35 (2006) estabelece a utilização da análise de regressão linear que verifica a relação entre duas variáveis.

Neste caso, estuda-se a variação de estabilidade dos analitos ao longo do tempo. Caso não ocorra variação da concentração do analito em função do tempo, o material é considerado estável.

Em um modelo de regressão linear temos  $n$  observações de uma variável explicativa  $x$  e de uma variável de resposta  $y$ . O objetivo é estudar o comportamento de  $y$  para dados valores de  $x$ .

A resposta média de  $y$  ( $\mu_y$ ), tem a relação linear com  $x$ :

$$\mu_y = \alpha + \beta x$$

onde:

$\alpha$  = intercepto;

$\beta$  = inclinação

A análise de regressão a partir da planilha de cálculos Excel fornece a estatística de regressão, o intercepto, a inclinação e os valores dos intervalos de confiança do intercepto e da declividade (MOORE, 2005).

A partir dos intervalos de confiança da inclinação pode-se inferir a correlação linear entre a variável explicativa e a de resposta. Esta irá ocorrer quando não for possível um valor igual a zero para a inclinação, em outros termos, quando o intervalo de confiança de  $\beta$  for diferente de zero (BARROS NETO et al., 2003).

Na prática, quando avaliamos os intervalos de confiança da inclinação com dois sinais positivos ou negativos podemos confirmar a existência de uma relação linear entre as variáveis. De forma contrária, quando os limites de confiança apresentam sinais opostos é provável que a inclinação ( $\beta$ ) seja 0, indicando assim a inexistência de relação linear entre as variáveis (BARROS NETO et al., 2003).

### **1.5. Considerações gerais para materiais de referência utilizados em microbiologia de alimentos**

Toxinfecções alimentares constituem um sério problema de saúde pública. Segundo estimativas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América, 76 milhões de pessoas adoecem anualmente no país, vítimas do consumo de alimentos contaminados. Cerca de 300.000 pessoas acabam sendo hospitalizadas e aproximadamente 5.000 vão ao óbito (CDC, 2008).

No Brasil segundo informações do Ministério da Saúde (MS), ocorreram 5.699 surtos de doenças transmissíveis por alimentos (DTA) no país no período de 1999 a

2007. Cento e quatorze mil trezentos e duas pessoas adoeceram, com um total de 61 óbitos. Dados da Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (COVEH) do MS indicam que dentre os casos de DTA notificados, classificados como de diferentes etiologias, 83,5% foram classificados como toxinfecções bacterianas. Dentre os casos de DTA notificados 42,2 % foram identificados como infecção por *Salmonella* spp., 20,2% por *Staphylococcus.aureus*, 6,8% por *Bacillus cereus*, 4,6% por *Clostridium perfringens* e 2,9% por *Shigella* sp. (CARMO, 2007).

A prática da análise microbiológica de produtos para o consumo humano tem sido utilizada durante décadas. Laboratórios que realizam o controle de qualidade microbiológico de alimentos possuem um importante papel, principalmente os que seguem critérios baseados em leis. Neste contexto, destaca-se a importância da constante verificação da competência desses laboratórios na produção de resultados precisos e confiáveis (PETERZ, 1992; ROBERT, 1999).

Como forma de avaliação das técnicas empregadas em um laboratório de microbiologia de alimentos, provedores de ensaios de proficiência oferecem escopos de ensaios qualitativos e quantitativos, direcionados para cada microrganismo pesquisado ou enumerado na rotina de análise (PETERZ, 1992).

Os ensaios qualitativos disponibilizados pelo programa de ensaio de proficiência francês o “*Réseau d’ Analyses et d’ Echanges en Microbiologie des Aliments*” (RAEMA), são avaliados por dois critérios: a sensibilidade, que verifica a habilidade do laboratório em detectar o microrganismo alvo na matriz contaminada e a especificidade que avalia a capacidade de diferenciar a bactéria pesquisada de outros microrganismos presentes na matriz, evitando a obtenção de resultados falso-positivos. Por outro lado, nos testes quantitativos é avaliado o desempenho do laboratório na obtenção de resultados numéricos próximos a um valor esperado, assim como a concordância de resultados ao analisar a mesma matriz de ensaio por duas vezes consecutivas (AUGUSTIN & CARLIER, 2006).

Como citado por Thompson e colaboradores (2006), os MR disponibilizados para EP devem apresentar similaridade aos materiais analisados na rotina do laboratório e devem ser avaliados, sem ter um tratamento diferenciado. Portanto, o MR mais apropriado para laboratórios de microbiologia de alimentos é o que apresenta um alimento como matriz. A utilização desses materiais durante um EP

propicia uma avaliação da totalidade dos procedimentos técnicos empregados na análise de um produto.

### **1.6. Matrizes utilizadas no preparo de MR em microbiologia de alimentos**

Visando a produção de MR para EP com matrizes de alimentos, provedores internacionais como o FEPAS - *Proficiency Testing* e o QMS – *Microbiology Proficiency Testing Scheme*, ambos da Inglaterra, utilizam diferentes matrizes para o preparo dos seus produtos. Dentre os analitos, ou seja, amostras oferecidas no programa dos últimos anos encontram-se MR em matriz de carne de frango, carne bovina, peixe, leite, farinha, chocolate, pimenta, salada, coco e arroz (FEPAS, 2009; QMS, 2009).

No Brasil o provedor PEP-SENAI comercializa MR de forma diferenciada. O MR a ser analisado é constituído de um frasco contendo uma matriz de alimento livre de contaminação e de um outro frasco com o(s) microrganismo(s) liofilizado(s) em uma substância diferente da matriz, cuja composição não é divulgada. No momento da análise o líofilo contendo o(s) microrganismo(s) é homogeneizado com a matriz. Para o ano de 2009 estão disponíveis pelo provedor PEP-SENAI materiais de referência preparados para análise em matrizes de carne, frango, pescado, cacau, leite em pó e queijo (PEP-SENAI, 2009). Provedores que comercializam MR para EP não divulgam o método de preparo dos materiais por eles produzidos.

Os únicos relatos sobre o preparo de MR para microbiologia de alimentos encontrados na literatura são aqueles que utilizam o leite como matriz.

O leite é um alimento de grande importância na dieta humana (MARGARIDO, 2009). É uma substância resultante da síntese das glândulas mamárias dos mamíferos (ICMSF, 2005). A composição do leite dos animais, aliado a distribuição equilibrada de nutrientes e a elevada digestibilidade, fazem do leite um dos componentes mais importantes na alimentação humana. É um dos alimentos mais complexos da natureza, apresentando um equilíbrio entre uma solução aquosa, uma emulsão fina de glóbulos de gordura e uma suspensão coloidal de proteínas com partículas gasosas de gás carbônico e oxigênio (LINCX, 2008).

As características físico-químicas do leite variam segundo a espécie animal. O leite de vaca apresenta na sua composição a maioria dos elementos essenciais à

dieta humana como aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais em quantidades maiores do que em qualquer outro produto (LINCX, 2008).

É comum a utilização de microrganismos na confecção de produtos lácteos, de modo a se obter texturas, sabores e aromas característicos. No entanto, podem também estar presentes microrganismos indesejáveis responsáveis pela deteriorização ou como patógenos, introduzidos nesses produtos por procedimentos de produção inadequados, falhas nos sistemas de processamento ou por práticas sanitárias impróprias (RICHTER & VEDAMUTHU, 2001).

A necessidade de controle desses microrganismos em leites e produtos lácteos, tem influenciado o desenvolvimento de métodos de enumeração e no estabelecimento de padrões microbiológicos que refletem a qualidade dos produtos (RICHTER & VEDAMUTHU, 2001).

Na microbiologia, o leite desnatado tem sido utilizado como agente crioprotetor em processos de dessecação de microrganismos e apresenta ação protetora para diferentes espécies (HUBÁLEK, 2003; MORGAN et al., 2006). Durante os processos de secagem de culturas bacterianas as proteínas do leite formam uma camada protetora na parte externa da célula bacteriana estabilizando os constituintes da membrana celular e promovendo o efluxo da água na célula sem alterar a sua estrutura (CARVALHO et al., 2004; HUBÁLEK, 2003).

## **1.7. Padrões microbiológicos para o controle microbiológico do leite em pó**

A Resolução N°12 de 2001, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001). Para a avaliação da qualidade microbiológica de leite em pó, são citados os seguintes parâmetros: ausência de *Salmonella* sp., limite de 10 UFC/g para coliformes a 45°C, limite de 10<sup>2</sup> UFC/g para estafilococos coagulase positiva e limite de 5 x 10<sup>3</sup> UFC/g para *Bacillus cereus*.

### **1.7.1. Gênero *Salmonella***

O gênero *Salmonella* é representado por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, móveis por flagelo peritríqueos, com

exceção dos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Espécies do gênero fermentam a glicose, produzindo ácido e gás, porém não metabolizam a lactose e a sacarose, são oxidase negativa e catalase positiva, utilizam o citrato como única fonte de carbono, descarboxilam a lisina e não hidrolisam a uréia. Têm como temperatura ótima de crescimento a faixa de 35 a 37°C e mínima em torno dos 5°C (FRANCO & LANDGRAF, 2002). São relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C, por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2002). Podem sobreviver durante anos em alimentos com baixa atividade de água (Aa), necessitando do mínimo de 0,94 de Aa para iniciar o crescimento (ICMSF, 1996).

As *Salmonella* spp. se encontram amplamente distribuídas na natureza sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório natural. Entre os animais, as aves são os reservatórios mais importantes (D'AOUST et al., 2001).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*. Apenas a espécie *S. enterica* apresenta subespécies, dentre elas estão: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (EUZÉBY, 2009; TINDALL et al., 2005). Cada subespécie abriga um número distinto de sorovares. A classificação em sorovares baseia-se nos seus antígenos de superfície somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (KONEMAN et al., 2001).

Os sorovares pertencentes a *S. entérica* subsp. *enterica* são designados por nomes que relatam geralmente a região geográfica onde o sorovar foi pela primeira vez isolado. Sorovares pertencentes a outras subespécies são designados pela sua forma antigênica que segue o nome da subespécie. Existem atualmente 2541 sorovares do gênero *Salmonella*, sendo que aproximadamente 60% do total pertencem a *S. enterica* subsp. *enterica* (POPOFF et al., 2004).

Uma nova espécie denominada *Salmonella subterrânea* foi recentemente isolada de sedimento na região aquífera de Oak Ridge nos Estados Unidos. O estudo da sequência ribossomal indicou 96,4 % de similaridade com a espécie *S. bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004).

Durante as etapas preliminares das análises de pesquisa de *Salmonella* spp., como isolamento e identificação, é comum a seleção equivocada de colônias de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

O perfil fenotípico da espécie *Citrobacter freundii* tem grande similaridade com a maioria dos sorovares de *Salmonella*. Segundo relatos de Farmer e colaboradores

(1985), cepas recebidas no CDC como *Salmonella* não tipáveis, foram posteriormente identificadas como *C. freundii*.

O gênero *Citrobacter* pertence à família *Enterobacteriaceae* e abriga 11 espécies, que são consideradas primariamente habitantes do trato intestinal de humanos e de animais (ABBOTT, 2007). *C. freundii* apresenta como uma de suas características bioquímicas a produção de sulfeto de hidrogênio, fato que dificulta a sua diferenciação de colônias de *Salmonella* spp. em meios de isolamento diferenciais, que tem o sistema de detecção de sulfeto hidrogênio como reação de diferenciação. Koneman e colaboradores (2001) indicam a prova da descarboxilação da lisina como característica chave para a diferenciação de *C. freundii* dos diferentes sorovares de *Salmonella*.

As infecções por *Salmonella* no homem podem ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, as febres entéricas e as gastroenterites ou salmoneloses. A febre tifóide e a febre entérica são causadas pela *Salmonella*. Typhi e *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) e as gastroenterites pelos demais sorovares. Esses quadros são caracterizadas por uma infecção intestinal que progride para uma infecção sistêmica. Os sintomas são febre alta, diarreia, vômito e septicemia, podendo durar de uma a oito semanas. As febres tifóide e entérica acometem somente o homem e são normalmente transmitidas por águas e alimentos contaminados com material fecal humano (D'AOUST et al., 2001; CAMPOS, 2005).

A gastroenterite é uma infecção aguda, com intensa inflamação da mucosa intestinal decorrente da invasão bacteriana. É clinicamente caracterizada por diarreia, geralmente acompanhada de náuseas, dor de cabeça, febre e vômito. Os sintomas aparecem em média 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo. Na maioria dos casos a infecção se limita ao intestino, por um período máximo de quatro dias, com a recuperação ocorrendo geralmente sem tratamento (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Investigações epidemiológicas têm indicado que a maioria das infecções humanas por *Salmonella* é resultante da ingestão de alimentos de origem animal, como carnes, produtos cárneos e ovos (RABSCH et al., 2001; VOETSCH et al., 2004).

Nos Estados Unidos, estima-se 1,4 milhões de casos de infecções anuais por *Salmonella*, com média de 600 mortes. Esta taxa corresponde a aproximadamente 31% das mortes relatadas pelo consumo de alimentos contaminados. Entretanto,



presume-se que a verdadeira ocorrência desta infecção seja bem maior, considerando-se que apenas 3% dos casos são oficialmente reportados (CDC, 2008).

Nas últimas décadas surtos de SE, reportados nos EUA, foram repetidamente associados ao consumo de alimentos contendo ovos crus ou mal cozidos (MISHU et al., 1994; OLSEN et al., 2001).

No Brasil a partir de 1981, diferentes relatos descreveram surtos de infecções alimentares por *Salmonella* Enteritidis (SE). Mota e colaboradores (1983) foram os que primeiramente descreveram surto de toxinfecção por SE no Brasil, na cidade de Curitiba. Araújo e colaboradores (1993) reportaram quatro surtos por SE associados ao consumo de alimentos contendo ovos, em Sorocaba. Kaku e colaboradores (1995) relataram um surto de toxinfecção alimentar por SE em uma escola na região Noroeste do Estado de São Paulo, a partir do consumo de maionese preparada com ovo cru. Peresi e colaboradores (1998) reportaram o isolamento de SE em 18 surtos ocorridos entre 1993 e 1997, também na região Noroeste do Estado de São Paulo, a partir do consumo de diferentes tipos de alimentos, que na grande maioria apresentava ovo cru ou ovo com cocção insuficiente na sua composição.

Mudanças no quadro epidemiológico das infecções por *Salmonella* não tifóides foram percebidas a partir da segunda metade do século XX, em todo o mundo. Como aspectos principais, ocorreram o aumento da incidência de casos de toxinfecções alimentares por *S. Enteritidis* e a emergência de cepas de *Salmonella* multirresistentes à drogas antimicrobianas (OLSEN et al., 2001; MOLBAK et al., 1999; RABSCH et al., 2001). De particular importância percebeu-se a emergência de cepas multirresistentes de *S. Typhimurium* DT 104, na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá (POPPE et al., 1998).

Para o estudo epidemiológico das infecções por SE é necessário a utilização de metodologias de tipificação capazes de diferenciar e separar os isolados. A fagotipagem tem sido uma das principais ferramentas utilizadas no estudo da disseminação epidêmica de diferentes sorotipos de *Salmonella*, indicando flutuações de alguns fagotipos e favorecendo o reconhecimento daqueles circulantes em um determinado período (BRICIO, 2004; SANTOS et al., 2003).

Cepas de SE fagotipos PT- 8 e PT- 13a, são comuns nos Estados Unidos, enquanto que em alguns países da Europa, o fagotipo PT- 4 é o mais freqüente (PERESI, 1998). No Brasil o estudo com isolados de fontes humanas e não humanas indicaram que até o início dos anos 90 o fagotipo PT- 8 predominava (FERNANDES et

al., 2003). Entretanto, nos anos seguintes, o fagotipo PT- 4 mostrou-se mais frequente (PERESI, 1998; SANTOS et al., 2003). O aumento significativo da ocorrência de SE pode estar associado ao intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa, o que pode ter facilitado a introdução e a disseminação do fagotipo PT- 4 no Brasil (IRINO et al., 1996, PERESI, 1998).

As infecções por *Salmonella* representam um grande desafio para a saúde pública, em razão da alta endemicidade e morbidade e acima de tudo pela dificuldade do seu controle (HOFER et al., 1997).

Considerando a importância do controle deste patógeno em alimentos, no Brasil a legislação vigente que determina os critérios microbiológicos para alimentos destinados ao consumo humano estabelece a ausência de *Salmonella* em 25g para todos os alimentos, no qual este microrganismo é indicado como parâmetro (BRASIL, 2001).

#### 1.7.2. *Bacillus cereus*

*B. cereus* é uma espécie bacteriana que se encontra amplamente distribuída na natureza, sendo comumente isolado de amostras de solo e de vegetais em crescimento. Por esta razão, contamina facilmente alimentos como cereais, condimentos, ervas e frutas (GRANUM, 2001).

Esta bactéria é caracterizada como bastonete Gram-positivo, aeróbio facultativo, com característica de formação de esporos, que favorecem a sobrevivência das células durante as condições ambientais adversas, como processos de cocção de alimentos, congelamento, dessecação e irradiação (KOTIRANTA et al., 2000). *B. cereus* multiplica-se bem entre 10 e 48°C apresentando uma temperatura ótima de crescimento entre 28 e 35°C. A atividade de água mínima necessária para o seu crescimento é de 0,95 e a faixa de pH em que ocorre multiplicação é de 4,9 a 9,3 (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Apresenta como fatores de virulência a produção de enterotoxinas, toxina emética, hemolisinas, lecitinase,  $\beta$ -lactamases e proteases (JAY, 2005).

Esta espécie é geralmente encontrada nos alimentos em quantidades menores que  $10^2$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC), por grama do alimento, nível geralmente considerado aceitável. Entretanto, alimentos apresentando mais que  $10^3$

UFC/g não devem ser considerados completamente seguros para o consumo, uma vez que o número de células pode aumentar rapidamente, se o alimento for mantido em condições de tempo e temperatura propícias à sua multiplicação (FORSYTHE, 2002).

O número de células de *B. cereus* necessário para desencadear quadros clínicos em humanos encontra-se na faixa de  $10^5$  a  $10^8$  UFC/g. No entanto, representantes desta espécie tem sido frequentemente isolados de alimentos envolvidos em quadros de surtos de toxinfecção alimentar com contaminações variando de  $5 \times 10^4$  a  $10^{11}$  UFC/g ou mL (GRANUM & LUND, 2006).

As enterotoxinas e a toxina emética são responsáveis por duas distintas formas de gastroenterites, definidas como síndrome diarréica e síndrome emética. Nesses tipos de enfermidade, é comum o alimento envolvido ter sido submetido a tratamento térmico, sendo os esporos sobreviventes a fonte da toxinfecção. O tratamento térmico promove a germinação dos esporos e a diminuição da microbiota competidora, fato que favorece a multiplicação do *B. cereus* (FORSYTHE, 2002; GRANUM, 2001).

A síndrome diarréica é causada por uma proteína de alto peso molecular, que é inativada pelo aquecimento a  $56^\circ\text{C}$  por 30 minutos ou em pH abaixo de 4. A enterotoxina é produzida durante o crescimento da bactéria no intestino delgado é antigênica e apresenta atividade hemolítica. Tem como mecanismo de ação, o estímulo da adenilciclase na mucosa intestinal, promovendo o acúmulo de sais e eletrólitos, além de ter atividade dermonecrótica e de permeabilidade vascular (GRANUM & LUND, 2006). O período de incubação varia de 8 a 24 horas e os sintomas desta enfermidade são diarréia aquosa, dores abdominais, raramente ocorrendo náuseas e vômitos. A duração da doença é de 6 a 12 horas (JAY, 2005). Os alimentos envolvidos nos casos diarréicos, descritos na literatura são vegetais crus e cozidos, produtos cárneos, pescados, massas, leite, sorvetes e pudins a base de amido (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

O quadro da intoxicação do tipo emético é caracterizado por náuseas e vômitos que ocorrem após um período de 1 a 6 horas de incubação. A toxina emética, denominada cereulicina, consiste em um peptídeo. A biossíntese e o mecanismo de ação desta toxina não foram ainda elucidados (GRANUM & LUND, 2006). Esta proteína é resistente ao pH ácido e as enzimas proteolíticas. Apresenta também resistência ao aquecimento a  $126^\circ\text{C}$  por até 90 minutos e não é antigênica (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Os surtos de intoxicação do tipo emético são geralmente

associados com produtos contendo arroz, entretanto alimentos ricos em amido como batatas e massas, assim como produtos lácteos (FORSYTHE, 2002).

Em um pequeno número de casos, indivíduos podem apresentar os dois tipos de sintomas, devido à produção simultânea da toxina diarréica e da emética (GRANUM, 2001).

O tipo de intoxicação dominante varia de país para país, podendo ser associado aos hábitos alimentares de cada região. No Japão a ocorrência do tipo emético é dez vezes maior que do tipo diarréico, enquanto na Europa e na América do Norte o tipo diarréico é predominante (GRANUM, 2001).

A curta duração dos quadros de intoxicação por esta bactéria faz com que os casos não sejam geralmente notificados. Poucas são as informações a respeito do número de casos (GRANUM & LUND, 2006). Alguns países têm publicado dados ocorridos nas últimas décadas: na Holanda, *B. cereus* foi considerado a causa mais comum de toxinfecção alimentar, no período de 1991 a 1994. Na Tailândia, Schoeni & Wong (2005) descreveram a bactéria como o terceiro principal agente de doenças veiculadas por alimentos entre 1986 e 1995. Mead e colaboradores (1999) estimaram que mais de 27.000 casos das toxinfecções alimentares que ocorrem anualmente nos Estados Unidos são causadas por *B. cereus*.

No Brasil, dados de surtos causados por *B. cereus* são escassos, entretanto estudos da avaliação microbiológica indicam a presença deste microrganismo em diferentes tipos de alimentos como: macarrões (MC KNIGHT et al., 1990), doces industrializados (GOMES et al., 2004), leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT (REZENDE-LAGO et al., 2007).

A quantificação de *B. cereus* em amostras de alimentos tem sido realizada através da utilização de meios seletivos diferenciais (BENNETT & BELAY, 2001). A diferenciação bioquímica desta bactéria de outras espécies do gênero *Bacillus* exige procedimentos bioquímicos adequados e o domínio da técnica de identificação.

## **1.8. Métodos de preservação de microrganismos**

A água molecular constitui um componente crítico nos mecanismos de reação das células e contribui para a estabilidade das proteínas, do DNA e dos lipídios, além de conferir a ordem estrutural das células. Métodos de dessecação têm como objetivo

a remoção de quase toda a água da célula, cessando ou retardando o metabolismo celular, mantendo assim organismos viáveis e estáveis (POTTS, 1994).

Métodos de preservação de microrganismos têm sido utilizados durante décadas. Dentre as técnicas descritas na literatura a dessecação e o spray-dryer estão entre as mais aplicadas.

A remoção de água por spray-dryer baseia-se na estabilização do microrganismo alvo de forma rápida, sem permitir que sejam iniciados processos fisiológicos de adaptação ao estresse, que geralmente ocorrem durante a dessecação. O processo consiste na obtenção de material em forma de grânulos secos a partir da atomização de uma solução contaminada. A solução é injetada em forma de spray em contra corrente a um jato de ar que se encontra a temperatura superior a 200°C. Esta técnica apresenta um custo relativamente baixo, quando comparado com a liofilização. Estudos recentes indicaram a possibilidade da utilização da técnica para a preservação de bactérias probióticas (MORGAN et al., 2006).

A variação da viabilidade indica que as alterações sofridas pelas células podem ocorrer também durante a estocagem. Desta forma, devem ser investigadas possíveis modificações na forma de estoque de células desseçadas por spray-dryer, a fim de se obter células viáveis por longos períodos (MORGAN et al., 2006).

O método de liofilização consiste na remoção lenta de cristais de água congelada por sublimação, sob vácuo. 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 líofílos por longos períodos de tempo, com menor risco de contaminação e sem demandar manipulação adicional (CARVALHO et al. 2004; COSTA & FERREIRA, 1991).

O ciclo de liofilização pode ser dividido em duas etapas, secagem primária e secundária. A primária consiste na sublimação dos cristais de gelo. Este efeito é obtido com a redução da pressão no condensador do aparelho. Na fase secundária, toda a água congelada é sublimada restando somente a água “ligada” à matriz sólida da célula, que necessita de um período prolongado para ser removida. A eficiência de secagem da fase secundária é determinada pela análise da umidade residual nos materiais após a liofilização (MORGAN et al., 2006).

Apesar da aparente simplicidade da técnica de liofilização, vários parâmetros devem ser considerados, para a obtenção de bons resultados. Cabe enfatizar que diferentes espécies bacterianas apresentam comportamentos distintos frente às condições de liofilização e estoque (COSTA & FERREIRA, 1991).

Os procedimentos que antecedem a liofilização, a técnica em si e a reconstituição do líofilo podem desencadear efeitos indesejáveis aos microrganismos como a desnaturação de algumas enzimas, o aumento da permeabilidade da membrana celular, danos no DNA e a consequente perda da viabilidade das células (CARVALHO et al. 2004; COSTA e FERREIRA, 1991).

Assim, alguns autores relataram procedimentos importantes no preparo e na manutenção de materiais liofilizados, a fim de se evitar perdas na viabilidade celular. De acordo com Morgan e colaboradores (2006) e Potts (1994), para o preparo da suspensão bacteriana devem ser utilizadas culturas no final da fase logarítmica e no início da fase estacionária, fase que corresponde ao máximo de resistência da maioria das bactérias às condições adversas. Carvalho e colaboradores (2004); Hubálek (2003) e Morgan e colaboradores (2006) destacaram a importância da utilização de crioprotetores, como carboidratos, proteínas e polímeros no aumento da estabilidade de microrganismos durante o processo de dessecação e estocagem. Morgan e colaboradores (2006) indicaram a importância da prática do congelamento rápido, que promove a formação de cristais de gelo de pequenas dimensões, evitando danos às células. Miyamoto-Shinohara e colaboradores (2008) reportaram a presença de umidade residual em culturas bacterianas liofilizadas e sugerem que após um eficiente processo de liofilização os frascos contendo os líofilos sejam fechados sob condições de alto vácuo e estocados a -20°C, a fim de se reduzir a atividade da água molecular.

Morgan e colaboradores (2006) relataram experimentos que comprovaram a importância da etapa de reconstituição do líofilo com fluidos que apresentam teor nutricional e osmolaridade adequados ao reparo das células injuriadas.

### **1.9. Técnicas de produção e manutenção de materiais de referência para microbiologia de alimentos**

O grande desafio na produção de MR para EP destinados a ensaios microbiológicos é a instabilidade natural dos microrganismos, que dificulta o desenvolvimento, a produção e o uso desses materiais (HAYES, 1996; IN'T VELD,

1998; PHILIPP et al., 2007). Na produção do MR as células bacterianas são fortemente afetadas por fatores como variações de temperatura e estresse sofrido durante o processo de dessecação (PHILIPP et al., 2007). Desta forma, os microrganismos podem se multiplicar, morrer ou mesmo sofrer injúrias subletais durante a produção e estoque (JANNING et al., 1995).

Peterz e Norberg (1983) indicam que MR devem atender aos requerimentos de homogeneidade e estabilidade. No entanto, MR preparados para serem utilizados em EP, são na maioria das vezes utilizados próximos a sua produção, não necessitando de avaliação quanto a estabilidade por longos períodos (PETERZ & STENERYD, 1993). Para Janning e colaboradores (1995), antes da utilização de MR microbiológicos em EP devem ser também verificadas as características fenotípicas e imunológicas da(s) bactéria(s) alvo, que não devem sofrer modificações durante o processo de produção do MR.

Diferentes autores relatam os procedimentos utilizados no preparo de MR para uso em EP na área de microbiologia de alimentos. Na Suíça, Peterz e Norberg (1983), estimulados pela prática da utilização destes ensaios em laboratórios clínicos, desenvolveram MR para microbiologia de alimentos utilizando a técnica de liofilização. Os materiais foram preparados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de alimentos na rotina de análise do laboratório e liofilizadas em meio de cultura contendo albumina de soro bovino. Os resultados do estudo indicaram a obtenção de materiais homogêneos e estáveis, quando avaliados após dois dias de transporte a temperatura ambiente. Os autores verificaram também a perda de viabilidade dos MR, quando estocados a temperatura ambiente durante intervalos de cinco a dez semanas.

Beckers e colaboradores (1985) produziram e avaliaram um MR contendo *Salmonella* sp. em matriz de leite em pó. A técnica de preparo utilizada foi o spray-dryer. O MR foi produzido esperando-se uma média de contaminação na ordem de 6,5 células de *Salmonella* sp. por cápsula contendo 0,2 g do leite contaminado. Foi avaliada a homogeneidade do material e a estabilidade a 4°C, 22°C e 37°C, durante a estocagem por aproximadamente 120 dias.

Em um novo estudo Peterz e Steneryd (1993), produziram dois novos materiais homogeneizando culturas de seis diferentes microrganismos em caldo soro inositol. O primeiro material apresentava as bactérias: *Micrococcus luteus*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* Dublin;

o segundo material: *Staphylococcus saprophyticus*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Salmonella* Anatum. Os materiais foram liofilizados e estocados à temperatura de 2 a 6°C. Foram realizados testes para avaliação da homogeneidade e estabilidade em longo prazo com temperaturas de estoque. Entretanto, os testes de estabilidade mostraram decréscimos significativos no número de células após 1 ano de estocagem a 2-6°C. As taxas de declínio foram em média maiores para as bactérias Gram-negativas. Dentre os microrganismos estudados as taxas de declínio das bactérias coliformes variaram de 0,01 a 0,02 unidades de log<sub>10</sub> por semana. A média de perda detectada para os outros microrganismos foi menor que 0,007 unidades de log por semana.

Na busca da obtenção de MR mais estáveis para o uso em EP em laboratórios de análise de alimentos e de águas, nove diferentes materiais foram desenvolvidos pelo *National Institute of Public Health and Environmental Protection* (RIVM) dos Países Baixos, com apoio da *European Commission* (EC), durante o período de 1986 a 1995. Dentre os materiais produzidos estão os MR para detecção de *Salmonella sp.*, enumeração de *E. coli*, de *B. cereus*, de *S. aureus* e de *C. perfringens*. Alguns desses MR foram posteriormente certificados (IN'T VELD, 1998, PHILIPP et al., 2007).

O método de produção de MR utilizado pelo RIVM consiste na obtenção de leite em pó com uma alta concentração de bactérias (LPAC), a partir de uma suspensão de leite líquido contaminado processado por spray-dryer. Para o preparo do material final o LPAC é misturado com leite em pó livre de contaminação, até a concentração de células desejada. A etapa seguinte consiste na distribuição do leite em cápsulas de gelatina, em quantidades de aproximadamente 0,3g/cápsula. As cápsulas são então estocadas a temperatura de -20°C (IN'T VELD, 1998).

Janning e colaboradores (1995) conduziram um levantamento do estudo da estabilidade dos diferentes MR produzidos pelo RIVM pela técnica descrita acima e concluíram que os melhores resultados de estabilidade ocorreram quando os MR foram estocados a -20°C. O levantamento também avaliou a exposição de MR a possíveis temperaturas de transporte: -20°C, 22°C, 30°C e 37°C, durante 4 semanas.

O *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) da Bélgica disponibiliza MRC envasados em cápsulas preparados pela técnica de spray-dryer. Dentre os materiais comercializados destacam-se: MRC para enumeração de *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*; *B. cereus* e de *Enterococcus faecium*, além de materiais para detecção de *E.coli* O157 e de *L.*



*monocytogenes*. Os controles desses materiais indicaram suficiente homogeneidade e estabilidade durante 10 anos de estoque (PHILIPP et al., 2007).

## **2.0. Disponibilidade de ensaios de proficiência no Brasil e no exterior**

Em alguns países europeus são oferecidos programas contínuos de EP. Na Inglaterra, o *Public Health Laboratory Service* (PHLS), lançou no início dos anos 90 programas de EP em microbiologia, para laboratórios de alimentos, de água e para laboratórios clínicos. O programa consiste no envio de no mínimo doze amostras anuais por laboratório. Cada ensaio de rotina é avaliado pelo menos uma vez por ano. Na área de alimentos este suporte foi desenvolvido para atender a critérios da legislação e para avaliar a competência dos laboratórios dos estados membros do mercado comum europeu. Entretanto, a participação em programas contínuos traz vários benefícios para a melhoria da qualidade dos ensaios dos laboratórios participantes (ROBERTS, 1999).

Na França, o RAEMA consiste em um programa de EP aberto a todos os tipos de laboratório na área de microbiologia de alimentos. O programa disponibiliza MR para a maioria dos ensaios da rotina de um laboratório de microbiologia de alimentos. Esses programas representam uma observação privilegiada para o acompanhamento da evolução analítica dos laboratórios participantes (AUGUSTIN & CARLIER, 2002; AUGUSTIN & CARLIER, 2006).

No Brasil, segundo dados da ANVISA (2006), no período entre 2004 e 2005 ocorreu uma discreta redução da participação de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) em ensaios e programas de EP nacionais e internacionais oferecidos no país.

Como proposta de incentivo, capacitação, avaliação e reconhecimento da qualidade técnica desses laboratórios da área de Microbiologia de Alimentos a GGLAS/ANVISA ofereceu no ano de 2006 a participação desses laboratórios em programas de EP. Foram disponibilizadas amostras de diferentes matrizes de alimentos contaminados com microrganismos de importância no controle microbiológico desses produtos. As amostras foram adquiridas de provedores de EP internacionais, através de recursos do Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e da ANVISA (ANVISA, 2006).

Apesar do aumento da procura da participação em EP, a disponibilidade destes ensaios no nosso país é escassa. A grande maioria das ofertas é dada por provedores internacionais, o que faz com que os valores cobrados para a participação sejam bastante elevados. Além disso, devem ser destacadas as exigências burocráticas feitas pelos países exportadores na liberação das amostras, principalmente as que apresentam conteúdo biológico. A dificuldade na liberação alfandegária no Brasil constitui também outro problema, algumas vezes fazendo com que o material chegue ao laboratório de análise fora das especificações de temperatura, ou mesmo com o prazo de início de análise ultrapassado (INCQS, 2008).

A prática da participação de laboratórios brasileiros em EP internacionais demonstra a fragilidade técnica do país na produção de MR e facilita a divulgação dos resultados obtidos pelos nossos laboratórios para provedores no exterior.

Desta forma, é de fundamental importância o incentivo à capacitação de provedores de EP nacionais, na produção de materiais de referência com qualidade elevada e com valores inferiores aos cobrados no exterior (INCQS, 2008).

Diante destes fatos, destaca-se a importância da formação e capacitação de laboratórios brasileiros provedores de EP em Microbiologia de Alimentos, que possam oferecer MR para ensaios de proficiência com qualidade reconhecida e preços mais baixos que os disponíveis no mercado internacional. Tal prática poderá contribuir na harmonização dos laboratórios brasileiros, públicos e privados, no sentido da avaliação da qualidade técnica, aprimorando assim a capacidade analítica na área da segurança alimentar (INCQS, 2008).

## **2.1. RELEVÂNCIA DO PROJETO**

A capacitação do INCQS como produtor de MR para EP na área de microbiologia de alimentos permitirá a geração de MR, que no futuro poderão ser disponibilizados sem custos aos LACEN. Esta participação poderá auxiliar na melhoria da qualidade das análises dos laboratórios de alimentos e conseqüentemente no suporte às ações de controle e fiscalização sanitária de alimentos no país.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Central

- Padronizar metodologia de produção de MR para EP em microbiologia de alimentos utilizando o método de liofilização.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações de inóculo a serem utilizados no preparo dos diferentes lotes de MR.
- Padronizar os procedimentos de contaminação da matriz.
- Avaliar a reprodutibilidade da técnica no preparo de lotes com as mesmas concentrações de células.
- Produzir MR para EP, destinado à detecção de *Salmonella* sp. em matriz de leite em pó.
- Produzir MR para EP, destinado à enumeração de *Bacillus cereus* em matriz de leite em pó.
- Produzir MR para EP, destinado à detecção de *Salmonella* sp. e enumeração de *Bacillus cereus* em uma mesma matriz de leite em pó.
- Implantar metodologias de controle para a avaliação da qualidade dos MR produzidos, como: verificação do vácuo, avaliação da pureza, determinação da umidade residual, teste da homogeneidade, teste da estabilidade e avaliação da manutenção das características fenotípicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A técnica escolhida para o preparo dos MR foi a liofilização. A seleção foi baseada no fato da liofilização ser um dos métodos de dessecação mais utilizados e mais eficientes na preservação de microrganismos (COSTA & FERREIRA, 1991; MORGAN et al., 2006). Aliado a isto, foi também considerado o acúmulo de anos de experiência do INCQS na prática da produção de culturas de referência bacterianas e fungicas pela técnica de liofilização.

O leite foi escolhido como a matriz do estudo, primeiramente por ser um alimento de grande importância na dieta humana (MARGARIDO, 2009). Além disso, é utilizado como agente crioprotetor em processos de liofilização de microrganismos (HUBÁLEK, 2003; MORGAN et al., 2006).

Considerando-se a possibilidade de estudo de um material para o ensaio qualitativo e outro para ensaio quantitativo foram selecionados para este estudo os microrganismos: *Salmonella* sp. e *B. cereus*. A espécie *C. freundii* foi também escolhida para fazer parte do estudo no preparo do MR destinado à detecção de *Salmonella* sp.

### 4.1. Local de desenvolvimento do estudo

Para o desenvolvimento do estudo foram utilizados equipamentos e a infraestrutura do Laboratório de Microrganismos de Referência (LMR) e dos Setores: de Alimentos, de Identificação Bacteriana e de Saneantes do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ.

### 4.2. Procedimentos de preparo dos MR para ensaio de detecção de *Salmonella* (analitos contaminados com *Salmonella* sp. e analitos contaminados com *Citrobacter freundii*) e MR para ensaio de enumeração de *B. cereus*.

Foram preparados quatro diferentes lotes de cada analito citado abaixo: *Salmonella* sp., lotes: S1, S2, S3 e S4; *C. freundii*, lotes: C1, C2, C3 e C4 e *B. cereus*, lotes: BC1, BC2, BC3 e BC4.

#### 4.2.1. Seleção e confirmação do perfil bioquímico das bactérias selecionadas

Para o ensaio de detecção de *Salmonella* sp. foram produzidos dois analitos distintos a serem utilizados em paralelo durante um EP. Um dos materiais foi preparado com células de *Salmonella* sp. e um segundo material com *C. freundii*. O objetivo da utilização dos dois materiais foi baseado na possibilidade da verificação da sensibilidade e da especificidade dos procedimentos laboratoriais empregados durante o ensaio.

A escolha da espécie *C. freundii* se deu, pelo fato desta apresentar as mesmas características de crescimento de *Salmonella* sp. no meio ágar de isolamento diferencial para detecção de bactérias intestinais ágar Entérico Hektoen, que é um dos meios de isolamento utilizados em ensaios de detecção de *Salmonella* sp. em alimentos. A característica da produção de sulfeto de hidrogênio, conferindo coloração preta às colônias, dificulta a diferenciação destes dois microrganismos no meio citado. Deste modo, a diferenciação é realizada somente na etapa de triagem, com o ágar três açúcares e ferro (TSI) e o ágar lisina ferro (LIA). A utilização do TSI avalia a capacidade do microrganismo de fermentar a glicose, a lactose e a sacarose, já o LIA indica a capacidade do microrganismo de descarboxilar a lisina. A característica utilizada na diferenciação destas bactérias está na incapacidade da *C. freundii* de descarboxilar a lisina.

A cepa de *C. freundii* utilizada no estudo foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), com número da coleção 5445, tendo sido isolada de um paciente do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho com quadro de infecção urinária.

Para a seleção da cepa de *Salmonella* sp. foi realizado um levantamento sobre o sorotipo e fagotipo de maior prevalência no Brasil nos últimos anos. Foi então, selecionada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis fagotipo PT- 4, depositada na Coleção de Pesquisa de Bactérias do INCQS, com número P3440, tendo sido obtida de uma amostra de sobre coxa de frango congelada. A caracterização sorológica e a classificação do fagotipo foram anteriormente realizadas pelo Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ.

Para o preparo do MR a ser utilizado na enumeração de *B. cereus*, foi selecionado aleatoriamente, um isolado de amostra de farinha de mandioca, depositado na Coleção de Pesquisa de Bactérias do INCQS, com número P3441.

Antes do início da produção dos materiais, foi realizada a confirmação da identificação bioquímica dos três isolados, em sistema de identificação automatizado VITEK (BioMerieux, VITEK 32), localizado no Setor de Bacteriologia do Laboratório de Microrganismos de Referência/DM. Para a identificação da *Salmonella* sp. e do *C. freundii* foram utilizados cartões de identificação para bactérias Gram negativas (BioMerieux, GNI+ card) e para a identificação do *B. cereus* o cartão para Bacilos (BioMerieux, *Bacillus* card).

#### 4.2.2. Preparo das culturas estoque

Os procedimentos descritos abaixo foram utilizados para o preparo individual das culturas bacterianas de *Salmonella* sp., *C. freundii* e de *B. cereus*.

A cepa selecionada foi semeada em placa contendo ágar sangue de carneiro (Base para ágar sangue, MERCK), pela técnica de esgotamento. A placa foi incubada a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas. Após o período de incubação, uma colônia isolada foi transferida para tubo contendo 10 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI, MERCK), sendo incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Foi inoculado 0,1 mL do caldo BHI em placa de ágar tripticaseína de soja (TSA, MERCK), sendo espalhado na superfície do meio através da utilização alça de Drigalsky. A placa foi incubada a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Um volume de 10 mL de glicerol a 20% estéril (Glicerol p.a., MERCK) foi acrescentado na superfície do TSA. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky foi realizada homogeneização da camada de crescimento bacteriano com o glicerol. A suspensão de células obtida foi transferida para um tubo de ensaio, que posteriormente foi submetido à homogeneização em aparelho vortex (IKA, MST-1). Volumes de 0,5 mL da suspensão de células foram distribuídos em criotubos estéreis e estocados a  $-20^\circ\text{C}$  por um período mínimo de 24 horas.

#### 4.2.3. Preparo da cultura para uso nos procedimentos de produção dos MR

Antes do preparo de cada cultura, os criotubos utilizados foram retirados do freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  e mantidos a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos.

Para o preparo de cada cultura de *Salmonella* sp. um volume de 0,1 mL da cultura estoque foi transferido para tubo contendo 10 mL de caldo BHI. O tubo foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Após o intervalo de incubação, 1 mL da cultura foi transferido para um tubo próprio para centrifugação com capacidade de 1,5 mL. A cultura foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf, 5415D), regulada para um ciclo de 10.000 rpm por 5 minutos. Após o término da centrifugação o sobrenadante foi desprezado. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, no mesmo tubo, totalizando a centrifugação de 3 mL da cultura. O pelet obtido foi ressuspensionado com 6 mL de solução salina peptonada a 0,1% (Anexo 1), obtendo-se assim a suspensão de células para o preparo do material. O mesmo procedimento de preparo da suspensão de *Salmonella* sp. foi utilizado para *C. freundii*.

No preparo da cultura de *B. cereus*, um volume de 0,1 mL da cultura estoque foi transferido para um frasco erlenmeyer, com capacidade de 125 mL, contendo 60 mL de caldo BHI. O frasco foi homogeneizado e incubado a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Todo o volume 60 mL da cultura de BHI foi transferido para um tubo próprio para centrifugação com capacidade de 80 mL. A cultura foi centrifugada em centrífuga refrigerada (Deckman, J2-21) a 10.000 rpm por 15 minutos. O pelet foi ressuspensionado com 6 mL de solução salina peptonada a 0,1%.

#### 4.2.4. Controle da concentração de células

A leitura da densidade de células das suspensões preparadas foi realizada em aparelho espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-visible, W-601) em comprimento de onda de 530 nm, utilizando-se solução salina peptonada a 0,1% como branco. Quando necessário as soluções de *Salmonella* sp. foram diluídas até apresentarem valores de transmitância na faixa de 5 a 9%. O ajuste foi realizado com o objetivo de se atingir a concentração aproximada de 5 a  $9 \times 10^8$  células/ mL. O mesmo procedimento foi utilizado para o preparo das culturas de *C. freundii*.

Para as suspensões de células de *B. cereus* foi estabelecido ajuste de transmitância na faixa de 0,3 a 0,6%, a fim de se alcançar a concentração aproximada de  $1$  a  $5 \times 10^8$  células/ mL.

A partir do conhecimento aproximado da concentração de células das suspensões preparadas, foi calculado o fator de diluição a ser aplicado, para se obter a concentração desejada no MR liofilizado. Foi considerada a diluição que a suspensão de células sofreria quando homogeneizada com o leite (1:100), assim como as perdas de concentração de células previstas durante a liofilização, que geralmente ocorrem na faixa de 0,5 a  $1 \log_{10}$ .

Cada suspensão preparada foi utilizada para o preparo de dois diferentes lotes. As duplas de lotes preparados com as mesmas suspensões foram as seguintes: S1 e S2, S3 e S4; C1 e C2, C3 e C4; BC1 e BC2, BC3 e BC4. As duplas foram liofilizadas no mesmo ciclo de liofilização. Este procedimento teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade da técnica de preparo de diferentes lotes, utilizando uma mesma suspensão de células.

Após o processo de produção, foram avaliadas as equivalências entre os lotes preparados com as mesmas suspensões, através do Teste t, considerando nível de significância de 5%. O cálculo foi aplicado aos dados obtidos nos testes de homogeneidade, utilizando-se o programa Microsoft Excel.

#### 4.2.5. Procedimentos para a homogeneização da suspensão de células com a solução de leite desnatado a 10%

Para o preparo de cada um dos lotes um volume de 2 mL da suspensão bacteriana, na concentração definida para cada lote, foi adicionada a um erlenmeyer contendo 198 mL de leite desnatado a 10% (Skim Milk, DIFCO), autoclavado a  $110^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O material foi homogeneizado em placa com agitação magnética (Corning, PC-220), durante 10 minutos.

Após a homogeneização, foi realizado o controle da concentração de células de cada lote produzido através da contagem em duplicata, em TSA, utilizando a técnica Pour Plate. Quando necessário, foi realizada a diluição do material a partir da homogeneização de 0,5 mL do material homogeneizado em 4,5 mL de salina peptonada a 0,1% (diluição 1:10), até uma concentração favorável a contagem de 30 a 300 UFC/mL.



#### 4.2.6. Envase, congelamento e liofilização do material

Volumes de 1 mL foram transferidos para 88 frascos de vidro estéreis com capacidade de 4 mL, dispostos em estantes. Após o envase tampas de borracha estéreis foram encaixadas nos frascos. A quantidade de frascos foi estabelecida, obedecendo a capacidade do liofilizador (LIOTOP, K 105) utilizado no estudo.

Os frascos foram rapidamente congelados, através da imersão da base do recipiente em cuba contendo etanol p.a. 95% (VETEC) e gelo seco. Movimentos circulares foram aplicados para facilitar o congelamento do líquido no interior dos frascos. O material congelado foi armazenado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Revco, Ultima II).

Após um período mínimo de 24 horas, os frascos foram retirados do freezer e rapidamente posicionados com as tampas entreabertas, em aparelho liofilizador automático, onde foram submetidos a um ciclo de liofilização com duração mínima de  $24 \pm 1$  horas. Durante a liofilização foram verificadas as condições ideais de funcionamento do aparelho (temperatura abaixo de  $-40^{\circ}\text{C}$  e vácuo abaixo de 100  $\mu\text{Hg}$ ), segundo recomendações do fabricante.

Ao completar o período do ciclo de liofilização os frascos foram fechados sob condições de vácuo, através da utilização de sistema de vedação manual acoplado ao aparelho.

#### 4.2.7. Ensaio de controle

##### *4.2.7.1. Verificação de vácuo*

Logo após a retirada dos frascos do liofilizador foi realizada a verificação de vácuo dentro de cada um dos 88 frascos, através da utilização de aparelho emissor de centelha elétrica (Tesla Coil, 2-12-8). Durante a leitura, o vácuo foi detectado com o aparecimento de coloração no interior do frasco que variou de rosa a roxo. Os frascos com vácuo foram lacrados com tampa de metal, etiquetados, e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os frascos que não apresentaram vácuo foram descartados.

#### 4.2.7.2. Verificação da pureza

Para a verificação da pureza foram utilizados oito frascos de cada lote, número correspondente a 10% do número de frascos preparados em cada lote, conforme recomendações descritas no POP INCQS 65.3230.001 (INCQS, 2005).

Os frascos foram retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Foram então reconstituídos com 1 mL de salina peptonada a 0,1% a temperatura ambiente. Após 15 minutos, uma alçada de cada frasco reconstituído foi semeada, utilizando-se a técnica de esgotamento, em uma placa de ágar sangue.

Em paralelo foi realizada a semeadura, pela técnica de esgotamento, de uma cepa de referência de *S. Typhimurium* INCQS 0150 (ATCC 14028) e de *B. cereus* INCQS 00435 (ATCC 14579). O controle com cepa de referência de *C. freundii* não foi realizado devido a não disponibilidade de cepa adequada deste microrganismo para o estudo.

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , por  $24 \pm 2$  horas. Após o período de incubação foi verificado o crescimento de apenas um tipo de colônia nas placas semeadas, que foram comparados com a morfologia colonial das cepas de referência semeadas nas placas de ágar sangue controle.

Os MR que apresentaram placas com crescimentos de apenas um tipo de colônia foram considerados puros.

#### 4.2.7.3. Determinação da umidade residual

Três frascos de cada lote foram utilizados para o ensaio de determinação da umidade residual por gravimetria, segundo procedimentos descritos no POP INCQS 65.3130.001 (INCQS, 2008). Os frascos foram retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos.

Foram utilizados pesa filtros, previamente mantidos a  $60^\circ\text{C}$  por 1 hora em estufa (VWR, Vacun Oven), com atmosfera de pentóxido de fósforo anidro e pressão controlada para o máximo de 5 mm de mercúrio. Após retirados da estufa os pesa filtros foram resfriados por 20 minutos em dessecador com sílica gel e posteriormente pesados em balança analítica, com sensibilidade de 0,1 mg (METTLER TOLEDO, XS 205).

Os frascos contendo os líofilos foram abertos e com o auxílio de uma espátula foi realizada a maceração dos materiais. O conteúdo dos frascos foram transferidos para pesa filtros individuais e pesados em balança analítica, sendo obtido o peso do pesa filtro mais o peso da amostra. Após a pesagem os pesa filtros foram incubados a 60°C em atmosfera de pentóxido de fósforo anidro. Passadas 3 horas de incubação foram transferidos da estufa para o dessecador, onde permaneceram por 20 minutos. Foram então realizadas as primeiras pesagens dos pesa-filtros contendo as amostras dessecadas. Uma nova incubação a 60°C por 1 hora foi realizada e após o resfriamento em dessecador os pesa filtros foram novamente pesados. Este procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante. Os resultados foram calculados utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ de umidade residual} = [(A-B)/A_0] \times 100$$

Onde: A = peso do pesa-filtro + amostra, em gramas;

B = peso do pesa-filtro + amostra dessecada em peso constante, em gramas;

A<sub>0</sub> = peso da amostra original, em gramas.

A umidade residual foi calculada a partir do cálculo da média de 3 líofilos analisados.

A avaliação dos resultados foi realizada segundo recomendações do Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products (FDA, 1990), que descreve a faixa percentual de 1,0 a 3,0% de umidade residual, como ideal para produtos biológicos liofilizados.

#### *4.2.7.4. Teste da homogeneidade*

Dez frascos, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para o teste da homogeneidade, que ocorreu em um período máximo de 1 mês após ao processo de liofilização. A análise de cada um dos frascos foi realizada em duplicata.

Os frascos foram retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Os líofilos foram reconstituídos com 1 mL de salina peptonada a 0,1%, a temperatura ambiente e mantidos em repouso por 15 minutos.

Foram preparadas diluições decimais de acordo com a concentração final de cada lote.

A técnica aplicada na enumeração de *Salmonella* sp. e de *C. freundii* foi baseada na metodologia ISO 21528-2 (2004). Para a enumeração de *B. cereus* foi utilizada a metodologia descrita por Rhodehamel e Harmon (2001).

Para os lotes contendo *Salmonella* sp. e para os lotes contendo *C. freundii* volumes de 0,1 mL da diluição selecionada foram transferidos para a superfície de placas contendo ágar glicose bile vermelho violeta (VRBG, Anexo 1). Os inóculos foram espalhados com auxílio de alças de Drigalsky.

Na análise dos lotes, cujas previsões de contagem eram abaixo de 30 UFC/mL, foram utilizados volumes de 0,5 mL do líofilo reconstituído, nestes casos os inóculos foram transferidos para placas de Petri estéreis vazias. Em cada placa foi acrescentado um volume aproximado de 10 mL de ágar VRBG, a temperatura aproximada de 45°C. Foram aplicados movimentos horizontais nas placas, a fim de facilitar a homogeneização do inóculo com o meio. Após a solidificação do ágar foram acrescentados volumes adicionais de 15 mL do ágar VRBG. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Para a enumeração dos lotes de *B. cereus* a semeadura foi realizada através da transferência de volumes de 0,1 mL da diluição selecionada para a superfície de placa contendo ágar manitol gema de ovo com polimixina, segundo Mossel (MYP, MERCK). Os inóculos foram espalhados com auxílio de alças de Drigalsky. As placas foram incubadas a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias. Para *Salmonella* sp. e de *C. freundii* foram selecionadas placas contendo de 30 a 300 colônias. Foram enumeradas colônias de coloração rosa, bordas regulares, de tamanho médio nas semeaduras superficiais e pequeno nos crescimentos em profundidade.

No Agar MYP foram selecionadas placas contendo de 15 a 150 colônias. Foi realizada a contagem de colônias grandes com coloração rosa (manitol negativas), rodeadas por halo opaco resultante da ação da lecitinase.

Os resultados de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada frasco foram convertidos em  $\log_{10}$ , para a realização das análises estatísticas.

#### 4.2.7.4.1. Avaliação estatística da homogeneidade

Os resultados das contagens foram inicialmente tratados para a eliminação de valores dispersos, aplicando-se o teste de Cochran.

Foi então realizada a análise de dados através da análise da variância (ANOVA), utilizando-se programa Microsoft Excel. Para cada um dos lotes foram atribuídos diferentes valores de desvio padrão ( $\sigma_p$ ), de modo a se obter  $S_{am}^2 < c$ . A avaliação da homogeneidade foi realizada a partir da comparação dos valores da variância entre as amostras ( $S_{am}^2$ ) e o “c” crítico. Os materiais foram considerados homogêneos, com 95% de confiança, quando  $S_{am}^2 < c$ .

Foi realizada a avaliação da precisão do teste da homogeneidade, segundo Fearn e Thompson (2001), que estabelece a relação  $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ .

#### 4.2.7.5. Teste da estabilidade

O teste de estabilidade em longo prazo foi realizado mensalmente por 3 meses consecutivos. A cada análise mensal, 6 frascos de cada lote estocado a  $-20^\circ\text{C}$  foram submetidos a contagem. Os ensaios para a avaliação da estabilidade em curto prazo foram realizados após o teste de estabilidade de estoque do 3º mês.

Para o teste da estabilidade em curto prazo foram utilizados vinte e oito frascos de cada lote, divididos em dois grupos de quatorze. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, foi utilizada a metodologia do “isochronous design” (Lamberty et al., 1998). A cada dia 2 frascos de cada lote foram acondicionados em embalagem própria para transporte de material biológico. Dentro de cada caixa foram colocadas 2 unidades de gelo reciclável. Os frascos foram identificados pelo número de dias de incubação, iniciando-se com a incubação de 7 dias. O primeiro grupo foi incubado a  $25^\circ\text{C}$  e o outro grupo a  $35^\circ\text{C}$ . As condições de tempo e temperatura foram mantidas para todos os 14 frascos de cada grupo. Sete dias após a primeira incubação, os frascos foram analisados juntos, sob as mesmas condições de análise.

Para o controle da estabilidade em longo e em curto prazo, foram utilizadas as metodologias de enumeração descritas no item 4.2.7.4.

#### 4.2.7.5.1. Avaliação estatística da estabilidade

As avaliações da estabilidade em longo e em curto prazo foram realizadas através da construção de gráficos, onde os valores de contagem em UFC/mL foram convertidos em  $\text{Log}_{10}$  e plotados no eixo y, sendo então correlacionados com a variável tempo de estudo decorrido, posicionada no eixo x. Foram traçadas linhas de tendência, a fim de facilitar a visualização da dispersão dos dados.

Na análise estatística dos resultados foi aplicada a metodologia de regressão linear simples, através da utilização do programas Microsoft Excel.

A partir do coeficiente angular da inclinação foram obtidos os limites de confiança inferiores e superiores com 95% de confiabilidade. Os materiais analisados foram considerados estáveis quando os valores dos limites de confiança apresentam sinais opostos, indicando assim a inexistência de relação linear entre as variáveis.

#### 4.2.7.6. Verificação da manutenção das características fenotípicas

Para a verificação da manutenção das características fenotípicas das bactérias utilizadas no preparo dos MR, foram selecionadas aleatoriamente quatro colônias provenientes dos crescimentos obtidos nas placas de contagem da estabilidade do terceiro mês de estoque, de cada um dos lotes. Os isolados foram semeados em ágar nutriente (MERCK) e incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Foram utilizadas cepas de referência de *S. Typhimurium* INCQS 0150 (ATCC 14028) e de *B. cereus* INCQS 00435 (ATCC 14579). O controle com *C. freundii* não foi realizado devido a não disponibilidade de cepa deste microrganismo.

Para a verificação das características fenotípicas dos isolados de *Salmonella sp.* e *C. freundii* foram utilizados os meios citados por Andrews e Hammacks (2001), para a identificação bioquímica preliminar de *Salmonella sp.* em amostras de alimentos.

A partir do crescimento em ágar nutriente foi realizada a semeadura dos isolados em tubos de ensaio contendo os meios TSI (MERCK), LIA (MERCK), bem como em placas de ágar de isolamento seletivo diferencial Entérico Hektoen (MERCK).

Após a incubação a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas as características bioquímicas e as morfologias coloniais dos isolados estudados foram comparados com os perfis listados no Quadro 2.

**Quadro 2. Comportamento bioquímico de *Salmonella sp.* e *C.freundii* nos meios TSI, LIA e características do crescimento colonial em ágar Entérico Hektoen**

Microrganismo	Provas bioquímicas			Morfologia colonial em ágar Entérico Hektoen
	TSI <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> S <sup>b</sup>	LIA <sup>c</sup>	
<i>Salmonella sp.</i>	Alc <sup>d</sup> /Ácid <sup>e</sup>	+ <sup>f</sup>	+	Colônias azul esverdeadas com centro negro
<i>C. freundii</i>	Alc/Ácid	+	- <sup>g</sup>	Colônias verdes com centro negro

a – ágar três açúcares e ferro; b - sulfeto de hidrogênio; c – ágar lisina ferro; d – alcalino; e – ácido; f – positivo; g – negativo.

As culturas de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica segundo metodologia descrita por Rhodehamel e Harmon (2001).

De cada crescimento em ágar nutriente foi realizada a semeadura de uma alçada nos seguintes meios de cultura: caldo glicose com vermelho de fenol, caldo nitrato, caldo VP modificado, ágar tirosina, caldo nutriente e caldo nutriente contendo lisozima.

As características de cada um dos isolados estudados foram comparadas com os perfis bioquímicos listados no Quadro 3.

**Quadro 3. Comportamento de *B. cereus* nas provas bioquímicas**

Prova Bioquímica	Resultado para <i>B.cereus</i>
Utilização anaeróbica da glicose	+ <sup>a</sup>
Redução do nitrato	+
Produção de acetylmethylcarbinol	+
Decomposição da tirosina	+
Crescimento na presença de lisozima	+

a – positivo

### **4.3. Procedimentos de preparo dos MR mistos para os ensaios de detecção de *Salmonella* e enumeração de *B. cereus* em uma mesma matriz de leite em pó**

Foram preparados quatro diferentes lotes de MR mistos: SB1, SB2, SB3 e SB4. Durante o preparo dos MR, a matriz de leite desnatado a 10% foi homogeneizada com suspensões de células de *Salmonella* sp. e de *B. cereus*, em diferentes concentrações, que variaram para cada um dos lotes.

Os lotes de MR mistos foram preparados separadamente durante todo o processo de produção.

#### **4.3.1. Seleção e confirmação do perfil bioquímico das bactérias selecionadas**

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.1 para a seleção e confirmação de *Salmonella* sp. e de *B. cereus*.

#### **4.3.2. Preparo da cultura estoque**

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.2, para o preparo da cultura de *Salmonella* sp. e de *B. cereus*.

#### **4.3.3. Preparo da cultura para uso nos procedimentos de produção dos MR**

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.3, para o preparo das culturas de *Salmonella* sp. e de *B. cereus*.

#### **4.3.4. Controle da concentração de células**

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.4, para o controle e concentração de células de *Salmonella* sp. e de *B. cereus*.



#### 4.3.5. Procedimentos para a homogeneização da suspensão de células com a solução de leite desnatado a 10%

Para o preparo dos lotes volumes de 2 mL da suspensão de *Salmonella sp.* e 2 mL da suspensão de *B. cereus*, nas concentrações definidas para cada lote, foram adicionados a erlenmeyer contendo 196 mL de leite desnatado a 10%. O material foi homogeneizado em placa com agitação magnética durante 10 minutos.

#### 4.3.6. Envase, congelamento e liofilização do material

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.6.

#### 4.3.7. Ensaio de controle

##### 4.3.7.1. Verificação do vácuo

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.1.

##### 4.3.7.2. Verificação da pureza

Oito frascos de cada lote foram utilizados para a avaliação da pureza. Os frascos foram retirados do freezer e mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos. Os liófilos foram reconstituídos com 1 mL de salina peptonada a 0,1% a temperatura ambiente. Após 15 minutos foi semeada uma alçada de cada liófilo em uma placa de ágar sangue, através da técnica de esgotamento.

Em paralelo foi realizada a semeadura de uma cepa de referência de *S. Typhimurium* INCQS 0150 (ATCC 14028) e de *B. cereus* INCQS 00435 (ATCC 14579).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após  $24 \pm 2$  horas, foi observado o crescimento de dois diferentes tipos de colônias nas placas com os materiais analisados. As características coloniais das colônias obtidas foram comparadas com

as características das cepas de referência semeadas nas placas de ágar sangue controle.

#### *4.3.7.3. Determinação da umidade residual*

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.3

#### *4.3.7.4. Teste da homogeneidade*

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.4. Os procedimentos de contagens para *Salmonella* sp. e para *B. cereus* foram realizadas separadamente, nos meios seletivos apropriados para cada um dos microrganismos.

##### *4.3.7.4 1. Avaliação estatística da homogeneidade*

A avaliação da homogeneidade foi realizada separadamente com os dados obtidos na contagem para *Salmonella* sp.e para *B. cereus*, segundo procedimentos do item 4.2.7.4.1.

#### *4.3.7.5. Teste da estabilidade*

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.5.

##### *4.3.7.5.1. Avaliação estatística da estabilidade*

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.5.1. A avaliação da estabilidade foi realizada separadamente com os dados obtidos na contagem de *Salmonella* sp.e *B. cereus*.

#### *4.3.7.6. Verificação da manutenção das características fenotípicas*

Foram utilizados os procedimentos descritos no item 4.2.7.6, para a avaliação das características fenotípicas de *Salmonella* sp.e *B. cereus*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resultado da identificação bioquímica utilizando sistema de identificação automatizado VITEK

- a) Isolado de *Salmonella* sp. – Identificado como *Salmonella* sp., com 98% de positividade;
- b) Isolado de *C. freundii* - Identificado como *C. freundii*, com 99% de positividade;
- c) Isolado de *B. cereus* - Identificado como *B. cereus*, com 98% de positividade.

### 5.2. Resultados dos controles dos lotes produzidos

Os dados de controle da concentração de células, realizados durante todo o processo de preparo dos lotes de MR estão descritos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

**Tabela 1. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *Salmonella* sp.).**

Lote <sup>a</sup>	Leitura da transmitância da suspensão de células utilizada	Concentração máxima de células equivalente à transmitância lida	Diluição na ordem de 1:10, aplicada à suspensão de células	Concentração de células do material em UFC <sup>b</sup> /mL, após a homogeneização com leite, antes do envase	Concentração de células do material em UFC/mL, após a liofilização do material <sup>c</sup>
S1	8,5%	$9 \times 10^8$	3 diluições	$5,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
S2				$6,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
S3	7,8%	$9 \times 10^8$	4 diluições	$6,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
S4				$7,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$

a – Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp.(analitos contaminados com *Salmonella* sp.). b - Unidade Formadora de Colônias. c - Média calculada a partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade.

**Tabela 2. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *C. freundii*)**

Lote <sup>a</sup>	Leitura da transmitância da suspensão de células utilizada	Concentração máxima de células equivalente à transmitância lida	Diluição na ordem de 1:10, aplicada à suspensão de células	Concentração de células do material em UFC <sup>b</sup> /mL, após a homogeneização com leite, antes do envase	Concentração de células do material em UFC/mL, obtida após a liofilização do material <sup>c</sup>
C1	7,0%	$9 \times 10^8$	4 diluições	$7,0 \times 10^2$	$9,0 \times 10$
C2				$8,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
C3	7,9%	$9 \times 10^8$	3 diluições	$5,3 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$
C4				$7,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

a – Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *C. freundii*).  
 b - Unidade Formadora de Colônias. c - Média calculada a partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade.

**Tabela 3. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*.**

Lote <sup>a</sup>	Leitura da transmitância da suspensão de células utilizada	Concentração máxima de células equivalente à transmitância lida	Diluição na ordem de 1:10, aplicada à suspensão de células	Concentração de células do material em UFC <sup>b</sup> /mL, após a homogeneização com leite, antes do envase	Concentração de células do material em UFC/mL, obtida após a liofilização do material <sup>c</sup>
BC1	0,3%	$5 \times 10^8$	1 diluição	$1,1 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$
BC2				$1,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
BC3	0,3%	$5 \times 10^8$	2 diluições	$8,7 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$
BC4				$1,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$

a - lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*. b - Unidade Formadora de Colônias. c - Média calculada a partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade.

**Tabela 4. Controle da concentração de células, realizado durante o preparo dos lotes de MR mistos, destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. e ao ensaio de enumeração de *B. cereus*.**

Lote <sup>a</sup>		Leitura da transmitância da suspensão de células utilizada	Concentração máxima de células equivalente à transmitância lida	Diluição na ordem de 1:10, aplicada à suspensão de células	Concentração de células do material em UFC/mL <sup>b</sup> , após homogeneização com leite, antes do envase	Concentração de células do material em UFC/mL, obtida após a liofilização do material <sup>c</sup>
SB 1	S <sup>d</sup>	8,6%	$9 \times 10^8$	3 diluições	$6,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
	BC <sub>e</sub>	0,4%	$5 \times 10^8$	2 diluições	$5,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
SB 2	S	9,0%	$9 \times 10^8$	4 diluições	$9,1 \times 10^2$	$3,6 \times 10^2$
	BC	0,6%	$5 \times 10^8$	1 diluição	$2,6 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$
SB 3	S	6,5%	$9 \times 10^8$	3 diluições	$8,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
	BC	0,3%	$5 \times 10^8$	3 diluições	$4,4 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
SB 4	S	7,0%	$9 \times 10^8$	2 diluições	$8,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
	BC	0,4%	$5 \times 10^8$	2 diluições	$1,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$

a - lotes de MR destinados aos ensaios de detecção de *Salmonella* sp. e de enumeração de *B. cereus*.  
b - Unidade Formadora de Colônias. c - Média calculada a partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade. d - *Salmonella* sp.. e - *B. cereus*.

### 5.3. Avaliação da equivalência entre os lotes

O estudo da equivalência entre os lotes preparados com as mesmas suspensões estão relacionados na tabela 5.

**Tabela 5. Resultados da avaliação da equivalência entre os lotes realizada através do Teste t, com nível de significância de 5%.**

Lotes	Resultado da equivalência
S1 e S2 <sup>a</sup>	Equivalentes
S3 e S4 <sup>a</sup>	Não equivalentes
C1 e C2 <sup>b</sup>	Não equivalentes
C3 e C4 <sup>b</sup>	Não equivalentes
BC1 e BC2 <sup>c</sup>	Não equivalentes
BC3 e BC4 <sup>c</sup>	Equivalentes

a - Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *Salmonella* spp). b - Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *C. freundii*). c - Lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*.

Os lotes considerados equivalentes tiveram a verificação da estabilidade em longo prazo (estoque) e em curto prazo (transporte) realizadas com os dados de apenas um dos lotes.

## 5.4. Resultado dos controlos dos lotes produzidos

### 5.4.1. Verificação do vácuo

Os resultados da leitura do vácuo dos 88 frascos de cada lote produzido estão citados na tabela 6.

**Tabela 6. Percentual de frascos que apresentaram resultado satisfatório na leitura do vácuo após o processo de liofilização**

Lote	Número de frascos que não apresentaram vácuo	Percentual de resultados satisfatórios na leitura do vácuo, considerando o total de 88 frascos (%)
S1 <sup>a</sup>	0	100
S2 <sup>a</sup>	1 frasco	98,87
S3 <sup>a</sup>	0	100
S4 <sup>a</sup>	0	100
C1 <sup>b</sup>	2 frascos	97,5
C2 <sup>b</sup>	0	100
C3 <sup>b</sup>	0	100
C4 <sup>b</sup>	2 frascos	97,5
BC1 <sup>c</sup>	0	100
BC2 <sup>c</sup>	0	100
BC3 <sup>c</sup>	0	100
BC4 <sup>c</sup>	0	100
SB1 <sup>d</sup>	1 frasco	98,87
SB2 <sup>d</sup>	0	100
SB3 <sup>d</sup>	0	100
SB4 <sup>d</sup>	2 frascos	97,5

a – Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *Salmonella* sp.). b - Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *C. freundii*). c - Lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*. d – Lotes de MR destinados aos ensaios de detecção de *Salmonella* sp. e de enumeração de *B. cereus*.

### 5.4.2. Verificação da pureza

O resultado da avaliação da pureza foi satisfatório para todos os lotes analisados.

### 5.4.3. Determinação da umidade residual

A tabela 7 apresenta a leitura da umidade residual de três frascos de cada lote analisado e a média desta determinação.

**Tabela 7. Avaliação do resultado da umidade residual dos lotes liofilizados analisados, segundo recomendações do FDA (1990).**

Lote	Leitura da umidade residual				Avaliação do resultado
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Média <sup>e</sup>	
S1	2,30	2,28	2,36	2,29	Satisfatório
S2	2,11	2,34	2,20	2,21	Satisfatório
S3	1,26	1,19	1,21	1,22	Satisfatório
S4	1,01	0,90	1,12	1,01	Satisfatório
C1	0,93	0,95	1,02	0,97	Insatisfatório
C2	1,01	0,96	0,97	0,98	Insatisfatório
C3	1,23	1,11	1,02	1,12	Satisfatório
C4	0,96	1,00	1,13	1,03	Satisfatório
BC1	1,38	0,87	0,92	1,05	Satisfatório
BC2	0,99	0,98	1,15	1,04	Satisfatório
BC3	1,34	1,36	1,23	1,31	Satisfatório
BC4	1,08	1,03	1,22	1,11	Satisfatório
SB1	0,95	1,41	1,25	1,20	Satisfatório
SB2	1,54	1,72	1,35	1,53	Satisfatório
SB3	0,87	1,24	1,12	1,07	Satisfatório
SB4	2,03	1,96	1,55	1,83	Satisfatório

a – Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *Salmonella* sp.). b - Lotes de MR destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* sp. (analitos contendo *C. freundii*). c - Lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*. d – Lotes de MR destinados aos ensaios de detecção de *Salmonella* sp. e de enumeração de *B. cereus*. e - Média da soma dos 3 frascos analisados.

### 5.4.4. Verificação da manutenção das características fenotípicas

Durante a avaliação das características fenotípicas todos os isolados apresentaram perfil bioquímico e morfologia colonial característicos para cada uma das espécies estudadas, seguindo as informações descritas nos quadros 2 e 3, ilustrados no item 4.2.7.6 de “Material e Métodos”.

#### 5.4.5. Resultados do teste da homogeneidade

As Tabelas com numeração de 8 a 23 apresentam as contagens dos lotes produzidos, analisados em duplicata. As colunas da esquerda reúnem os dados de contagem utilizados no teste da homogeneidade em UFC/0,1 mL, que foram convertidos em Log para a realização do estudo estatístico. A coluna da direita apresenta as médias convertidas em UFC/mL, utilizadas na avaliação da estabilidade dos lotes em longo prazo, que serão abordados posteriormente.

Abaixo de cada tabela estão indicados os valores de desvio padrão atribuídos ( $\sigma_p$ ), para cada um dos lotes, as variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ ), o valor crítico do teste de homogeneidade ( $c$ ). Observa-se que a comprovação da homogeneidade é dada a partir da relação  $S_{am}^2 < c$ .

**Tabela 8. Resultado da contagem do Lote S1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (líófilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	140 e 156	1480
2	167 e 140	1535
3	151 e 168	1595
4	141 e 139	1400
5	144 e 175	1595
6	160 e 176	1680
7	212 e 224	2180
8	170 e 191	1805
9	154 e 165	1595
10	103 e 98	1005

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ )= 0,27;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0467;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0133;

Valor crítico do teste de homogeneidade ( $c$ )= 0,0145;

Resultado: Homogêneo.



**Tabela 9. Resultado da contagem do Lote S2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (líófilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	164 e 147	1555
2	152 e 148	1500
3	143 e 130	1365
4	133 e 131	1320
5	154 e 152	1530
6	125 e 119	1220
7	176 e 158	1670
8	159 e 157	1580
9	161 e 153	1570
10	148 e 140	1440

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ )= 0,10;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0199;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0015;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0021;

Resultado: Homogêneo.

**Tabela 10. Resultado da contagem do Lote S3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (líófilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	11 e 10	105
2	15 e 12	135
3	12 e 12	120
4	14 e 12	130
5	11 e 9	100
6	9 e 9	90
7	9 e 7	80
8	12 e 9	105
9	8 e 7	75
10	12 e 10	110

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ ) = 0,62;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0961;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0726;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0744;

Resultado: Homogêneo.

**Tabela 11. Resultado da contagem do Lote S4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,2 mL (líofilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	34 e 27	152
2	26 e 22	120
3	32 e 31	157
4	29 e 25	135
5	38 e 31	172
6	22 e 22	110
7	28 e 24	130
8	38 e 33	177
9	24 e 18	105
10	26 e 22	120

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ ) = 0,13;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0532;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0051;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade= 0,0057;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 12. Resultado da contagem do Lote C1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,5 mL (líofilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	40 e 33	73
2	45 e 43	88
3	51 e 50	101
4	56 e 51	107
5	18 e 14	32
6	56 e 52	108
7	63 e 52	115
8	54 e 54	108
9	49 e 47	96
10	37 e 34	71

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,39;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0391;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0271;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0273;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 13. Resultado da contagem do Lote C2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,2 mL (líófilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	27 e 31	146
2	17 e 14	78
3	22 e 21	108
4	23 e 19	106
5	19 e 25	111
6	29 e 32	153
7	39 e 39	194
8	26 e 26	130
9	33 e 37	174
10	25 e 26	128

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,36;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0228;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0215;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0225;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 14. Resultado da contagem do Lote C3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (líófilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL
1	97 e 89	930
2	112 e 105	1085
3	48 e 45	465
4	112 e 106	1090
5	97 e 89	930
6	51 e 49	500
7	119 e 107	1130
8	106 e 102	1040
9	70 e 66	680
10	120 e 108	1140

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,32;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0472;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0186;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0192;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 15. Resultado da contagem do Lote C4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	15 e 10	1250
2	18 e 9	1350
3	17 e 17	1700
4	23 e 18	2050
5	17 e 16	1600
6	16 e 12	1400
7	6 e 4	500
8	20 e 18	1900
9	14 e 12	1300
10	11 e 11	1100

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,32;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0966;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0259;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0268;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 16. Resultado da contagem do Lote BC1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (diluição 10 <sup>-2</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	57 e 46	51500
2	48 e 44	46000
3	53 e 40	46500
4	45 e 39	42000
5	45 e 40	42500
6	47 e 40	43500
7	57 e 55	56000
8	49 e 41	45000
9	41 e 41	41000
10	43 e 40	41500

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0467;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0008;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0039;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 17. Resultado da contagem do Lote BC2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (diluição 10 <sup>-2</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	31 e 30	30500
2	39 e 30	34500
3	44 e 41	42500
4	46 e 38	42000
5	40 e 36	38000
6	46 e 46	46000
7	40 e 34	37000
8	39 e 38	38500
9	45 e 39	42000
10	46 e 44	45000

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0403;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0023;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0033;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 18. Resultado da contagem do Lote BC3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	48 e 41	4450
2	37 e 32	3450
3	44 e 35	3950
4	48 e 40	4400
5	50 e 42	4600
6	41 e 41	4100
7	47 e 39	4300
8	36 e 34	3500
9	51 e 46	4850
10	41 e 39	4000

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0448;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0013;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0037;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 19. Resultado da contagem do Lote BC4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1 mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	43 e 40	4150
2	48 e 39	4350
3	38 e 36	3700
4	42 e 39	4050
5	43 e 37	4000
6	44 e 40	4200
7	43 e 36	3950
8	44 e 41	4250
9	36 e 36	3600
10	40 e 37	3850

a – Unidade formadora de colônias.

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0351;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0001;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0029;

Resultado: Homogêneo.

**Tabela 20. Resultado da contagem do Lote SB1 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	<i>Salmonella sp.</i>		<i>B. cereus</i>	
	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL	Contagem UFC/0,1mL (diluição 10 <sup>-2</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	41 e 33	3700	19 e 20	19500
2	20 e 17	1850	21 e 18	19500
3	56 e 35	4550	18 e 16	17000
4	70 e 60	6500	23 e 17	20000
5	27 e 20	2350	21 e 19	20000
6	12 e 12	1200	24 e 21	22500
7	15 e 10	1250	17 e 15	16000
8	14 e 12	1300	17 e 15	16000
9	30 e 28	2900	15 e 11	13000
10	15 e 14	1450	17 e 18	17500

a – Unidade formadora de colônias.

***Salmonella sp.***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,61;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0756;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0639;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0687;  
 Resultado: Homogêneo.

***B.cereus***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;  
 Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0523;  
 Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0034;  
 Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0045;  
 Resultado: Homogêneo.

**Tabela 21. Resultado da contagem do Lote SB2 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	<i>Salmonella sp.</i>		<i>B. cereus</i>	
	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1mL (líofilo reconstituído)	Média das contagens em UFC/mL	Contagem UFC/0,1mL (diluição 10 <sup>-2</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	15 e 14	150	91 e 89	90000
2	58 e 50	540	101 e 100	101000
3	40 e 38	390	78 e 69	74000
4	56 e 53	550	83 e 80	82000
5	36 e 28	320	85 e 78	82000
6	20 e 16	180	69 e 68	69000
7	23 e 20	220	87 e 83	85000
8	49 e 49	490	98 e 90	94000
9	58 e 55	570	91 e 82	87000
10	25 e 24	250	78 e 72	75000

a – Unidade formadora de colônias.

***Salmonella sp.***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,55;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0400;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0472;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0528;

Resultado: Homogêneo.

***B.cereus***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,11;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0220;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0023;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0025;

Resultado: Homogêneo.



**Tabela 22. Resultado da contagem do Lote SB3 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	<i>Salmonella sp.</i>		<i>B. cereus</i>	
	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL	Contagem UFC/0,1mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagens em UFC/mL
1	40 e 42	4100	14 e 23	1900
2	40 e 34	3700	11 e 5	900
3	20 e 27	2400	14 e 27	2100
4	48 e 27	3800	22 e 9	1600
5	49 e 48	4900	11 e 4	800
6	68 e 67	6800	27 e 31	2900
7	26 e 24	2500	9 e 8	900
8	20 e 17	1800	17 e 12	1500
9	76 e 69	7300	26 e 25	2600
10	113 e 86	6000	28 e 27	2800

a – Unidade formadora de colônias.

***Salmonella sp.***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,53;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0731;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0519;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0529;

Resultado: Homogêneo.

***B.cereus***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,24;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,1583;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0347;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0351;

Resultado: Homogêneo.

**Tabela 23. Resultado da contagem do Lote SB4 para o teste da homogeneidade e conversão das médias de contagem em UFC/mL para o teste da estabilidade.**

Frasco	<i>Salmonella sp.</i>		<i>B. cereus</i>	
	Contagem UFC <sup>a</sup> /0,1mL (diluição 10 <sup>-2</sup> )	Média das contagem em UFC/mL	Contagem UFC/0,1mL (diluição 10 <sup>-1</sup> )	Média das contagem em UFC/mL
1	23 e 14	19000	28 e 20	2400
2	11 e 10	11000	24 e 19	2200
3	9 e 8	9000	16 e 16	1600
4	20 e 15	18000	27 e 26	2700
5	13 e 5	9000	25 e 22	2400
6	15 e 13	14000	22 e 16	1900
7	17 e 11	14000	23 e 21	2300
8	22 e 16	19000	20 e 19	2000
9	9 e 8	9000	20 e 16	1800
10	13 e 8	11000	26 e 23	2500

a – Unidade formadora de colônias.

***Salmonella sp.***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,1312;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0119;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0191;

Resultado: Homogêneo.

***B.cereus***

Valor do desvio padrão ( $\sigma_p$ ) atribuído= 0,10;

Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )= 0,0585;

Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )= 0,0047;

Valor crítico do teste de homogeneidade (c)= 0,0051;

Resultado: Homogêneo.

**5.4.6. Resultados do teste da estabilidade**

Os resultados do estudo da estabilidade em longo prazo (estoque) e em curto prazo (transporte) estão descritos separadamente.

Devido à equivalência entre os lotes, os cálculos das estabilidades do lote S1 foram baseadas nos cálculos das estabilidades do lote S2, assim como os cálculos do lote BC4 foram baseados nos cálculos do lote BC3.

#### *5.4.6.1. Resultados do teste da estabilidade em longo prazo*

As Tabelas com numeração de 24 a 37 apresentam as médias das contagens em UFC/mL dos lotes produzidos, para os cálculos do teste de estabilidade em longo prazo.

As Figuras com numeração de 1 a 14, ilustram o perfil da concentração de células de cada lote ao longo dos 3 meses de estudo. As médias das contagens realizadas durante os testes da homogeneidade foram utilizadas representando o tempo 0 de estoque.

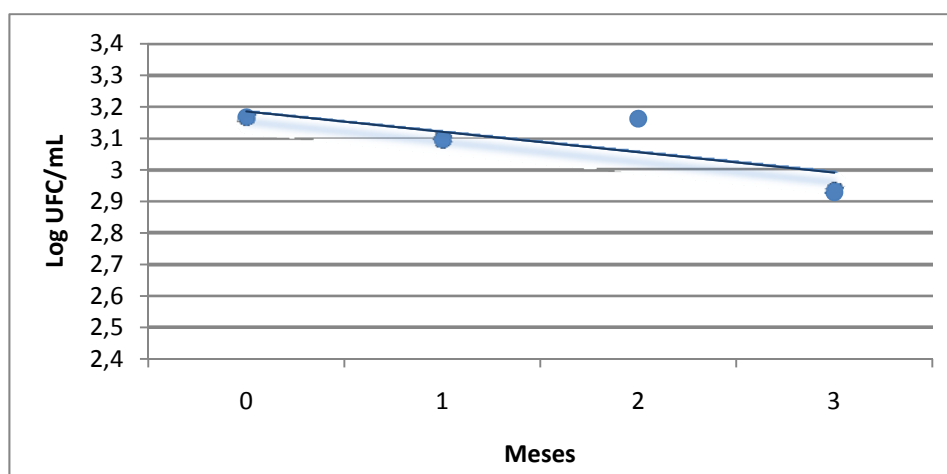
Abaixo de cada figura estão descritos os valores dos limites de confiança 95% do coeficiente angular de inclinação da análise de regressão linear, que definem a estabilidade do material. Quando os limites de confiança apresentam valores com sinais opostos indicam que o material não sofreu variação ao longo do período de estoque, sendo classificado como estável.

**Estabilidade em longo prazo (estoque) do Lote S1 - equivalente ao lote S2**

**Tabela 24. Estabilidade em longo prazo do Lote S2.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
1350	1430	930
1740	1500	810
1040	1470	820
1500	1550	790
1040	1360	880
970	1420	870

a – Unidade formadora de colônias.



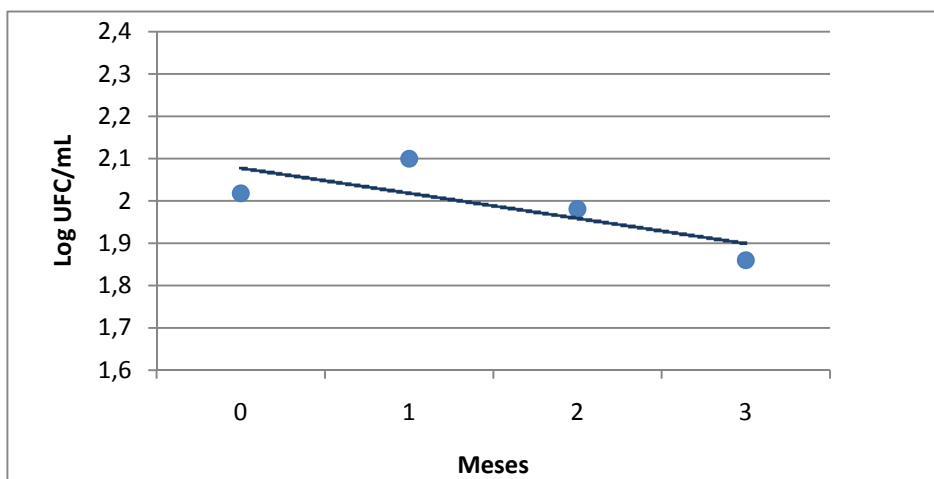
**Figura 1. Variação da concentração de células do lote S2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:** Inferiores (-0,238254579), Superiores (0,108852447)  
Resultado: Estável

**Tabela 25. Estabilidade em longo prazo do Lote S3.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
130	125	45
120	95	70
125	60	115
120	125	60
130	115	70
130	75	95

a – Unidade formadora de colônias.



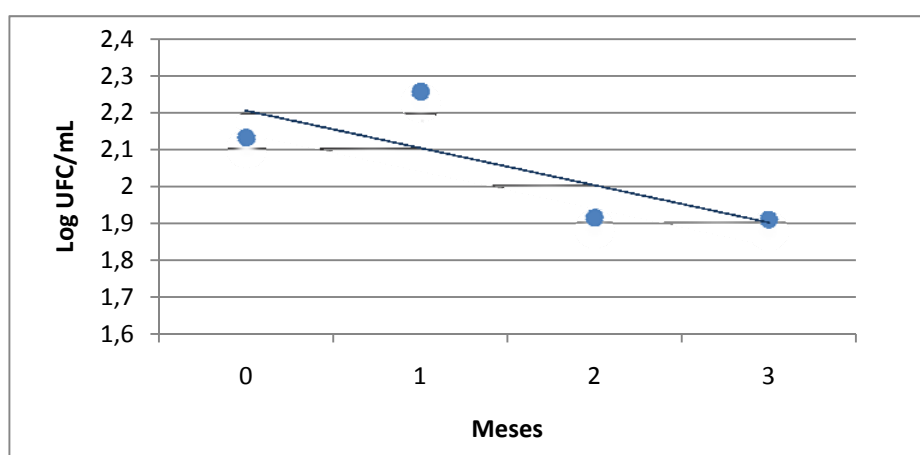
**Figura 2. Variação da concentração de células do lote S3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

Limites de confiabilidade 95%: *Inferiores* (-0,209532376), *Superiores* (0,090980480)  
Resultado: Estável

**Tabela 26. Estabilidade em longo prazo do Lote S4.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
150	115	80
190	60	105
235	130	75
235	60	115
180	75	60
125	75	65

a – Unidade formadora de colônias.



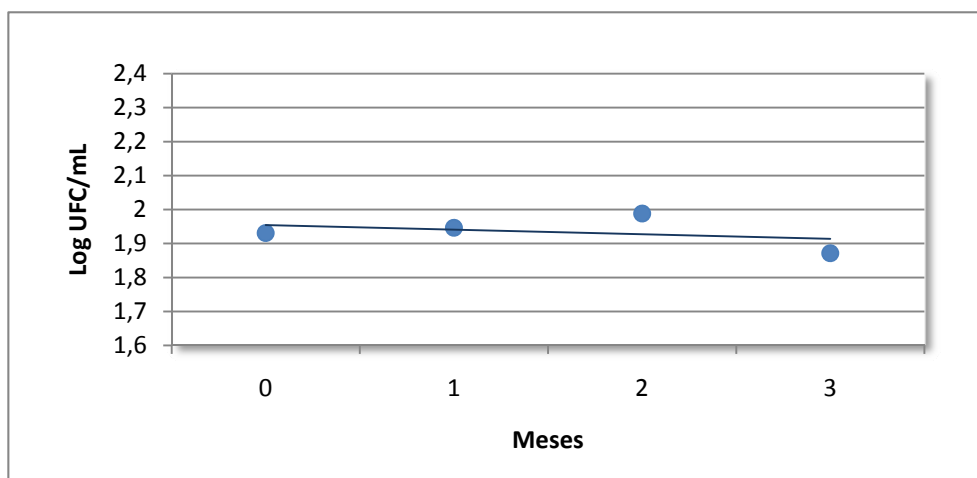
**Figura 3. Variação da concentração de células do lote S4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

Limites de confiabilidade 95%: Inferiores (-0,363520000), Superiores (0,159788000) - Resultado: Estável

**Tabela 27. Estabilidade em longo prazo do Lote C1.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
78	108	82
102	116	58
88	72	88
92	86	84
82	96	86
90	114	56

a – Unidade formadora de colônias.



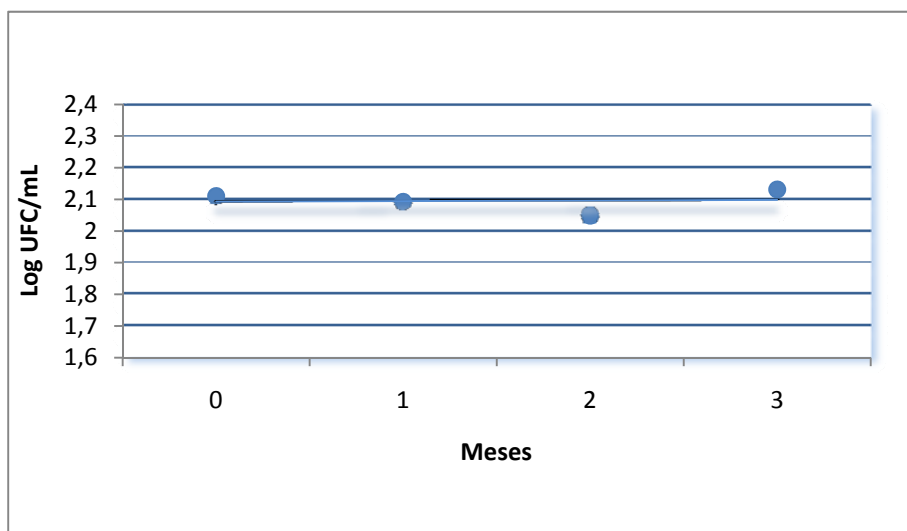
**Figura 4. Variação da concentração de células do lote C1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

Limites de confiabilidade 95%: Inferiores (-0,119679200), Superiores (0,09247968) - Resultado: Estável

**Tabela 28. Estabilidade em longo prazo do Lote C2.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
138	118	142
134	110	140
112	122	134
162	116	130
86	90	136
124	118	130

a – Unidade formadora de colônias.



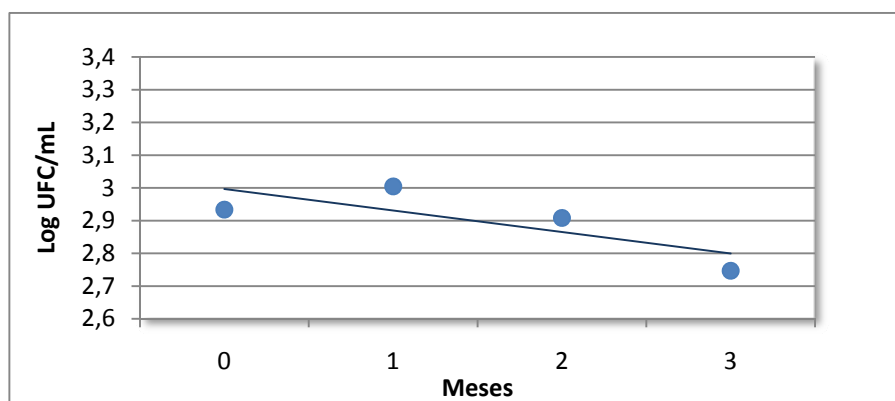
**Figura 5. Variação da concentração de células do lote C2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:** Inferiores (-0,081136320), Superiores (0,084708861) - Resultado: Estável

**Tabela 29. Estabilidade em longo prazo do Lote C3.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
1000	720	590
1120	880	510
1180	790	680
1080	990	500
800	650	470
930	870	630

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 6. Variação da concentração de células do lote C3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

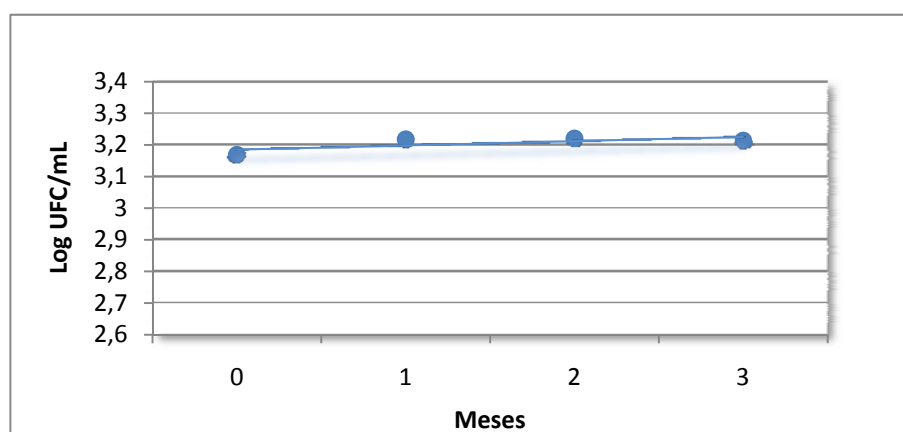
**Limites de confiabilidade 95%:** Inferiores (-0,2264056), Superiores (0,095107122) - Resultado: Estável



**Tabela 30. Estabilidade em longo prazo do Lote C4.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
1570	1690	1500
1580	1650	1710
1680	1520	1620
2000	1880	1590
1620	1790	1730
1500	1470	1670

a – Unidade formadora de colônias.



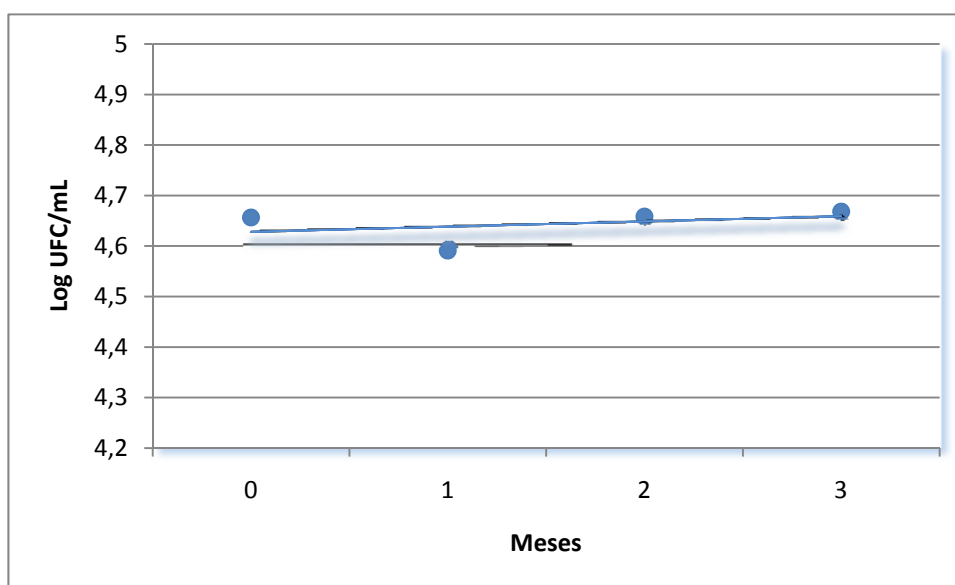
**Figura 7. Variação da concentração de células do lote C4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:** *Inferiores* (-0,025896310), *Superiores* (0,053155925) - Resultado: Estável

**Tabela 31. Estabilidade em longo prazo do Lote BC1.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
44000	40000	41000
43000	47000	52000
34000	48000	47000
39000	42000	41000
35000	50000	53000
40000	47000	47000

a – Unidade formadora de colônias.



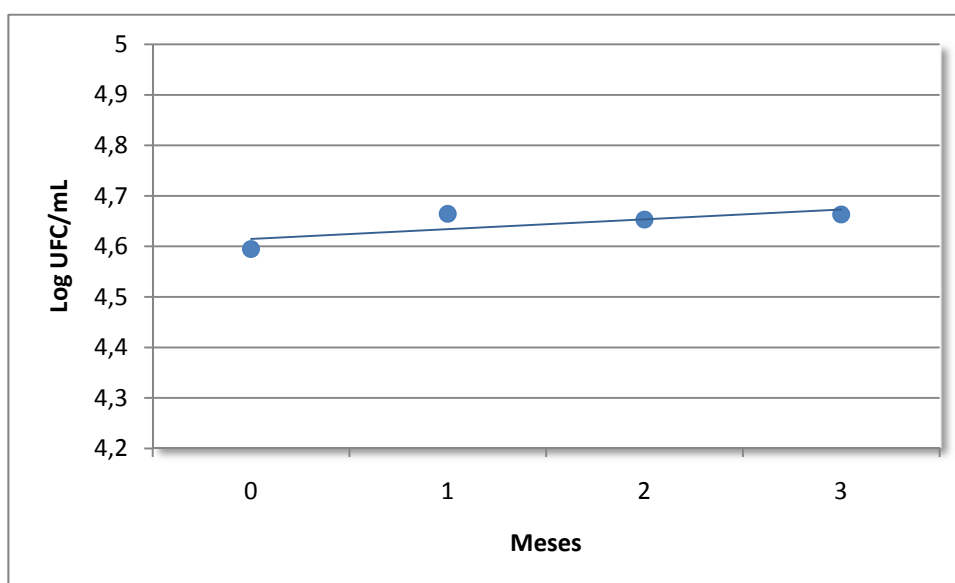
**Figura 8. Variação da concentração de células do lote BC1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:** Inferiores (-0,067090000), Superiores (0,087698000) - Resultado: Estável

**Tabela 32. Estabilidade em longo prazo do Lote BC2.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
50000	43000	52000
53000	41000	53000
41000	48000	45000
38000	48000	37000
48000	51000	40000
49000	40000	52000

a – Unidade formadora de colônias.



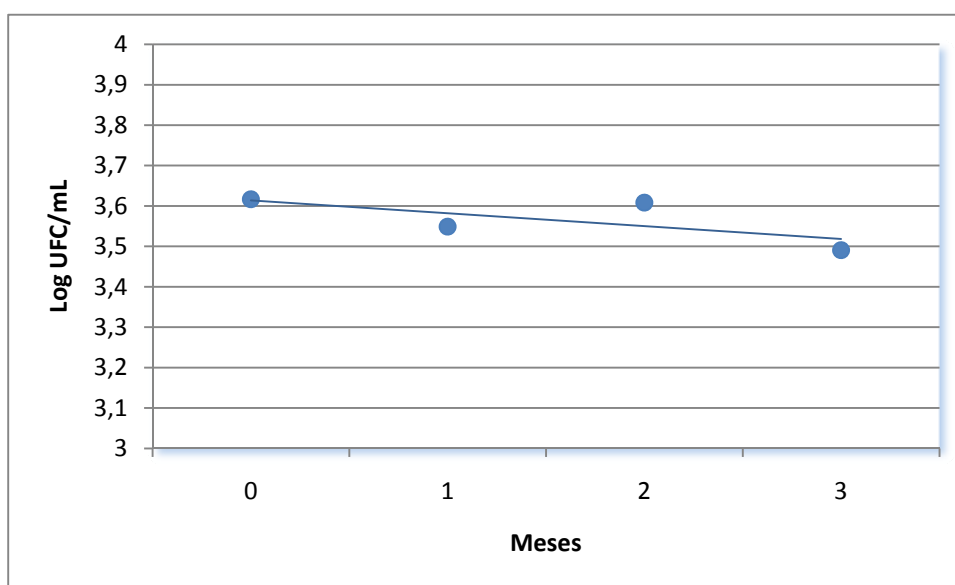
**Figura 9. Variação da concentração de células do lote BC2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:** *Inferiores* (-0,031850000), *Superiores* (0,070746000) - Resultado: Estável

**Tabela 33. Estabilidade em longo prazo (estoque) do Lote BC3.**

1º mês	2º mês	3º mês
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL	Média de contagem UFC/mL	Média de contagem UFC/mL
3900	4000	1800
3600	3700	4600
3800	3900	3700
3100	4200	2900
3500	4100	3300
3400	4500	3000

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 10. Variação da concentração de células do lote BC3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

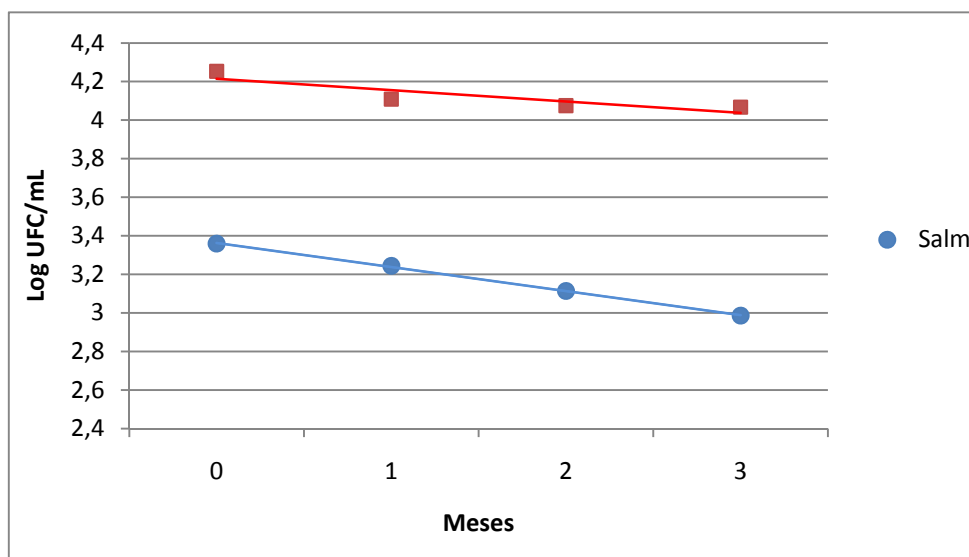
**Limites de confiabilidade 95%:** *Inferiores* (-0,130480000), *Superiores* (0,066766000) - Resultado: Estável

**Lote BC4 - equivalente ao lote BC3**

**Tabela 34. Estabilidade em longo prazo do Lote SB1**

1º mês		2º mês		3º mês	
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL		Média de contagem UFC/mL		Média de contagem UFC/mL	
<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>
2500	14500	1600	11400	1050	11300
1500	12000	1170	11100	880	10800
2800	13600	1350	11200	840	10900
1400	11200	1120	12900	930	12600
1100	12200	1220	13300	1190	12100
1800	13900	1390	11600	960	12500

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 11. Variação da concentração de células de *Salmonella* sp. e de *B. cereus* do lote SB1 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,135062813), Superiores (-0,114873623)

Resultado: Não estável;

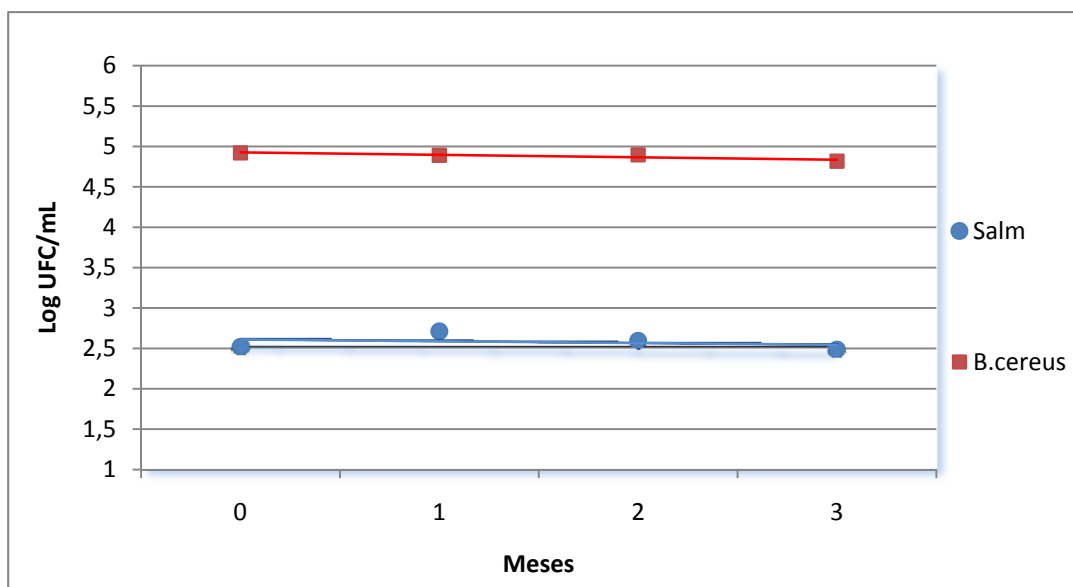
Para *B.cereus*: Inferiores (-0,155422384), Superiores (0,037278404)

Resultado: Estável.

**Tabela 35. Estabilidade em longo prazo do Lote SB2.**

1º mês		2º mês		3º mês	
Média de contagem UFC <sup>a</sup> /mL		Média de contagem UFC/mL		Média de contagem UFC/mL	
<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>
450	83000	430	81000	320	81000
550	91000	350	92000	330	92000
360	81000	430	70000	430	70000
590	77000	360	85000	240	85000
620	75000	280	82000	310	82000
570	63000	560	66000	240	66000

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 12. Variação da concentração de células de *Salmonella* sp. e de *B. cereus* do lote SB2 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,249057775), Superiores (0,205198567)

Resultado: Estável;

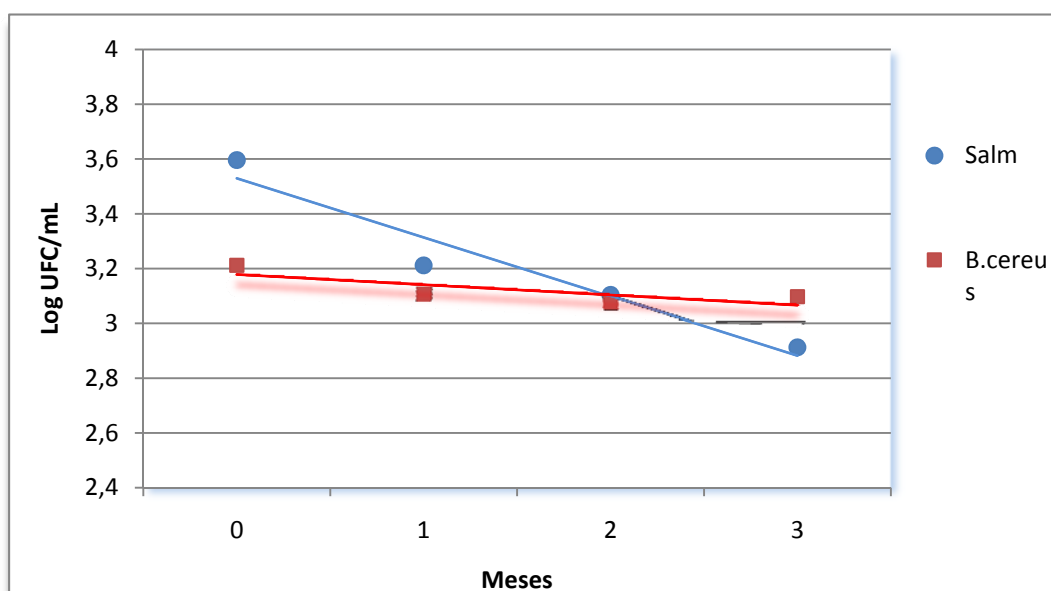
Para *B. cereus*: Inferiores (-0,079905099), Superiores (0,018938439)

Resultado: Estável.

**Tabela 36. Estabilidade em longo prazo do Lote SB3.**

1º mês		2º mês		3º mês	
Média de contagem		Média de contagem		Média de contagem	
UFC <sup>a</sup> /mL		UFC/mL		UFC/mL	
<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>
1070	1420	1390	1070	1270	1350
1580	1210	1210	1240	680	1370
1960	1350	1350	1050	870	1300
1700	1550	1550	1270	630	1200
1690	1300	1300	1210	750	1110
1950	920	920	1310	840	1200

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 13. Variação da concentração de células de *Salmonella sp.* e de *B. cereus* do lote SB3 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Para *Salmonella sp.*: Inferiores (-0,386867187), Superiores (-0,044666181)

Resultado: Não estável;

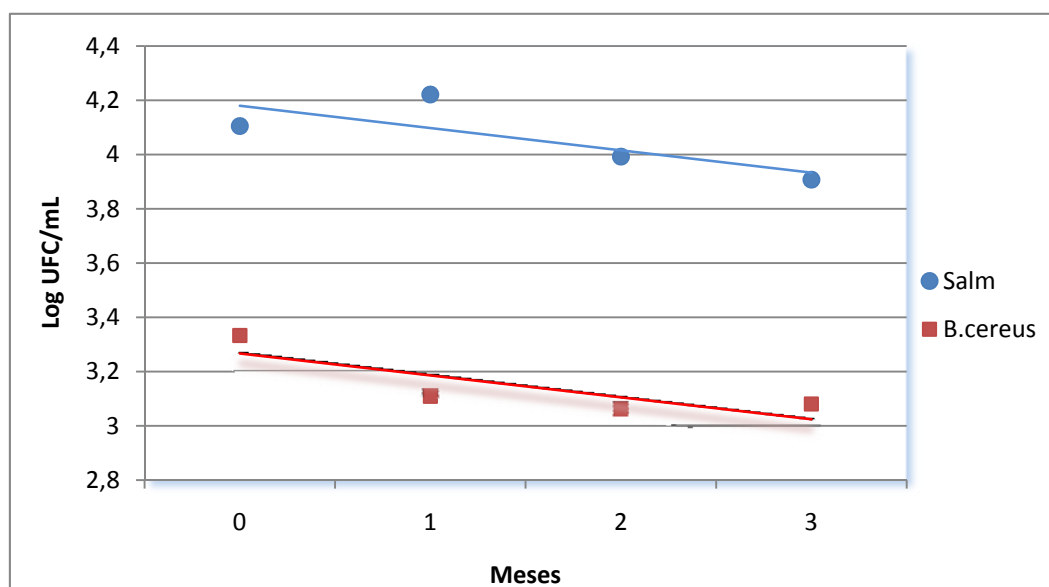
Para *B.cereus*: Inferiores (-0,125350372), Superiores (0,050594203)

Resultado: Estável.

**Tabela 37. Estabilidade em longo prazo do Lote SB4.**

1º mês		2º mês		3º mês	
Média de contagem		Média de contagem		Média de contagem	
UFC <sup>a</sup> /mL		UFC/mL		UFC/mL	
<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>
15300	1720	8700	1240	5700	1200
16300	1290	8600	1080	12000	1180
19700	1260	12500	1100	8100	1260
17100	1180	8600	1190	7600	1200
16200	1200	14600	1150	7700	1240
15600	1140	7700	1130	8600	1150

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 14. Variação da concentração de células de *Salmonella* sp. e de *B. cereus* do lote SB4 ao longo de 3 meses de estoque a -20°C. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (meses).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,284030406), Superiores (0,119841500)

Resultado: Estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,250643362), Superiores (0,089237133)

Resultado: Estável.



#### *5.4.6.2. Resultados do teste da estabilidade em curto prazo*

As Tabelas com numeração de 38 a 51 apresentam as médias de contagens em UFC/mL dos lotes produzidos, para os cálculos do teste de estabilidade em curto prazo.

As Figuras com numeração de 15 a 28 ilustram o perfil da concentração de células de cada lote ao longo dos 7 dias de estudo a temperatura de 25°C e a 35°C.

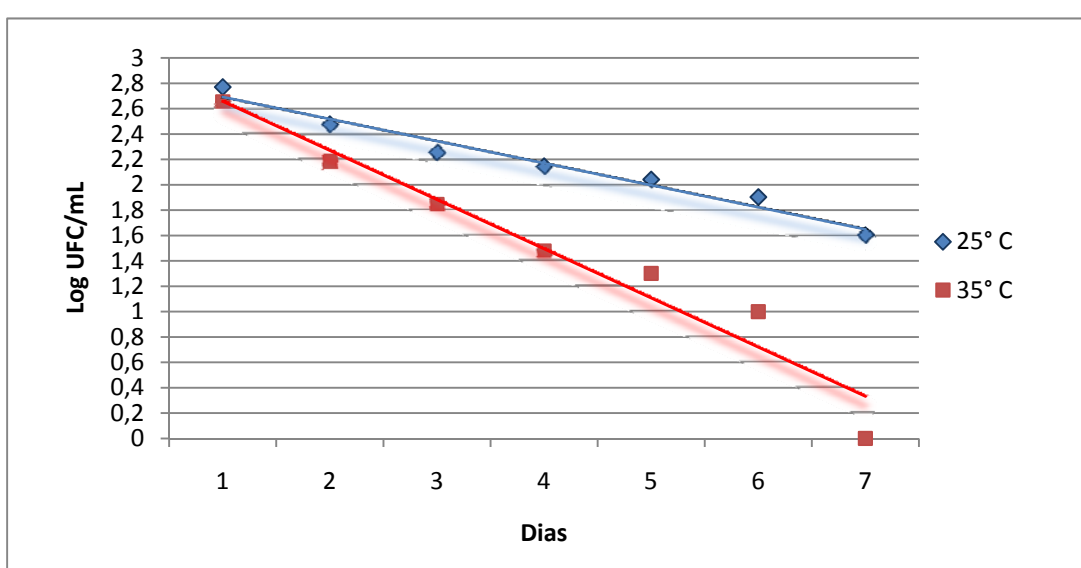
Abaixo de cada figura estão descritos os valores dos limites de confiança 95% do coeficiente angular de inclinação da análise de regressão linear da análise de regressão linear, que definem a estabilidade do material. Quando os limites de confiança apresentam valores com sinais opostos indicam que o material não sofreu variação ao longo do período de transporte, podendo ser classificado como estável.

**Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote S1 – equivalente ao lote S2**

**Tabela 38. Estabilidade em curto prazo do Lote S2.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	590	450
2	300	150
3	180	70
4	140	30
5	110	20
6	80	10
7	40	1

a – Unidade formadora de colônias.



**Figura 15. Variação da concentração diária de células do lote S2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,209614679), *Superiores* (-0,13812235)

Resultado: Não estável;

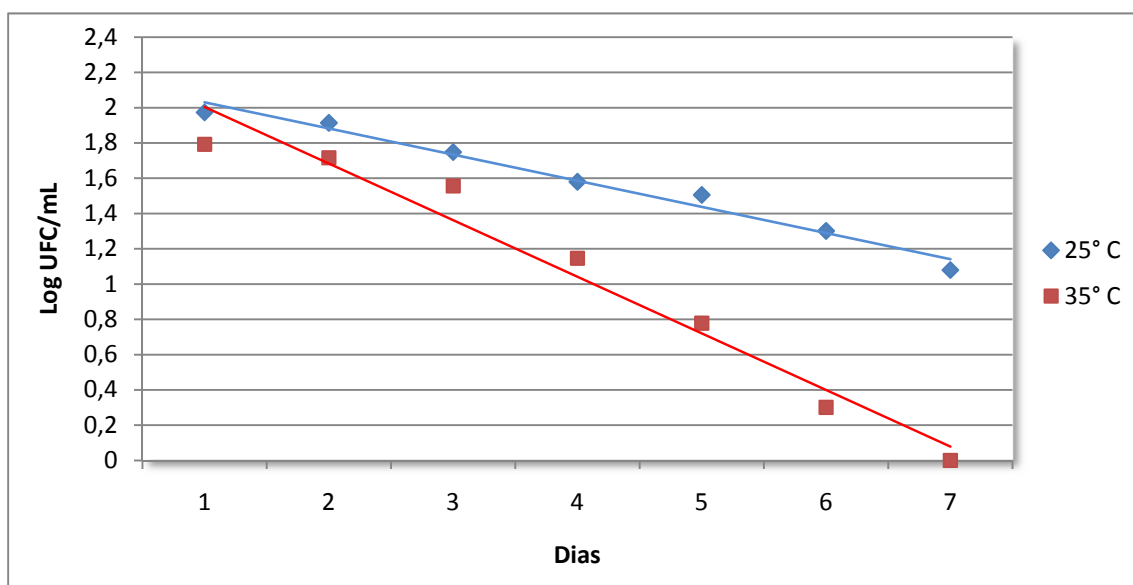
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,493462371), *Superiores* (-0,281958207)

Resultado: Não estável.

**Tabela 39. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote S3 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	94	62
2	82	52
3	56	36
4	38	14
5	32	6
6	20	2
7	12	1

a- Unidade formadora de colônias



**Figura 16. Variação da concentração diária de células do lote S3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,173059539), *Superiores* (-0,12340086)

Resultado: Não estável;

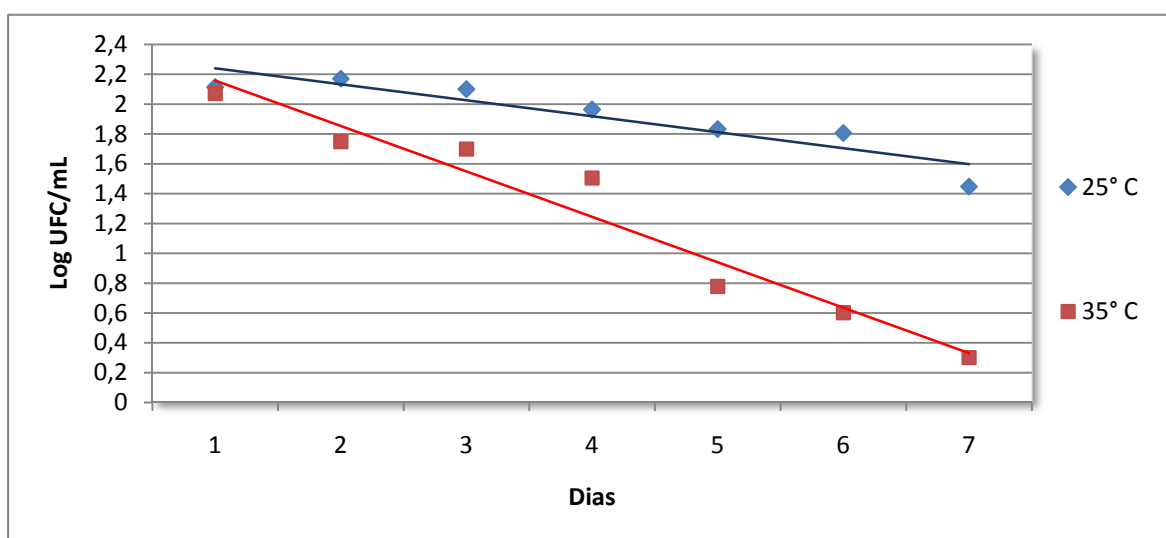
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,394170567), *Superiores* (-0,247634649)

Resultado: Não estável.

**Tabela 40. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote S4 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	130	118
2	148	56
3	126	50
4	92	32
5	68	6
6	64	4
7	28	2

a– Unidade formadora de colônias



**Figura 17. Variação da concentração diária de células do lote S4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,159437424), *Superiores* (-0,054589796)

Resultado: Não estável;

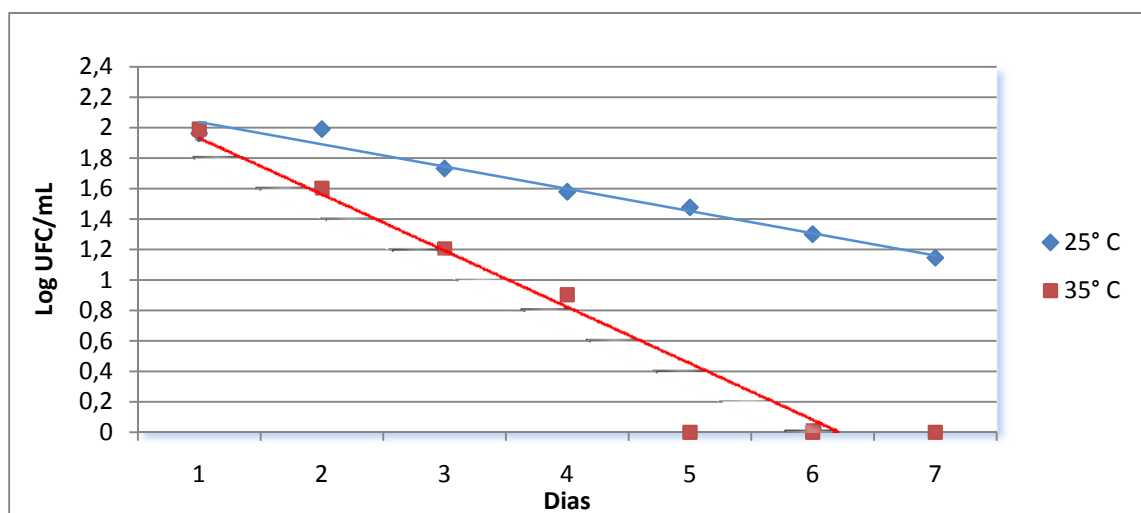
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,384941898), *Superiores* (-0,224031735)

Resultado: Não estável.

**Tabela 41. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C1 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	92	98
2	98	40
3	54	16
4	38	8
5	30	1
6	20	1
7	14	1

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 18. Variação da concentração diária de células do lote C1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,174158653), *Superiores* (-0,11788735)

Resultado: Não estável;

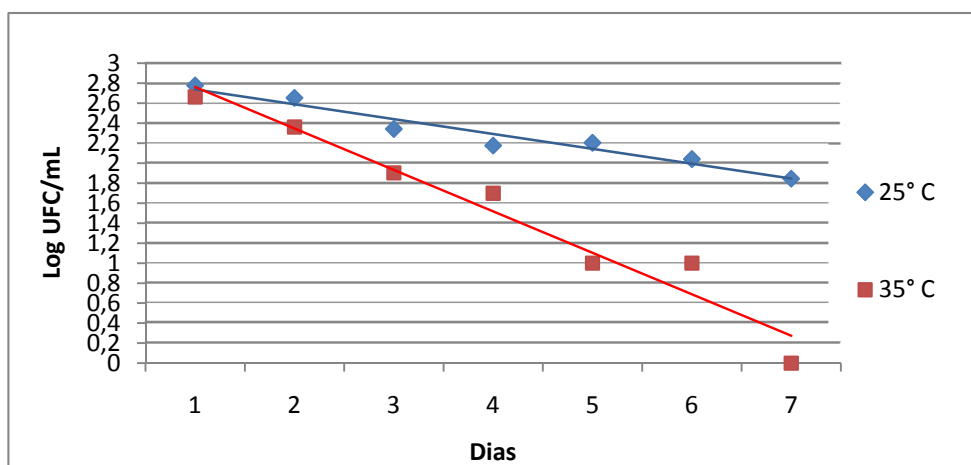
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,490840032), *Superiores* (-0,250725554)

Resultado: Não estável.

**Tabela 42. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C2 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	130	112
2	96	40
3	56	18
4	34	8
5	42	2
6	36	2
7	18	1

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 19. Variação da concentração diária de células do lote C2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,189055425), *Superiores* (--0,108166146)

Resultado: Não estável;

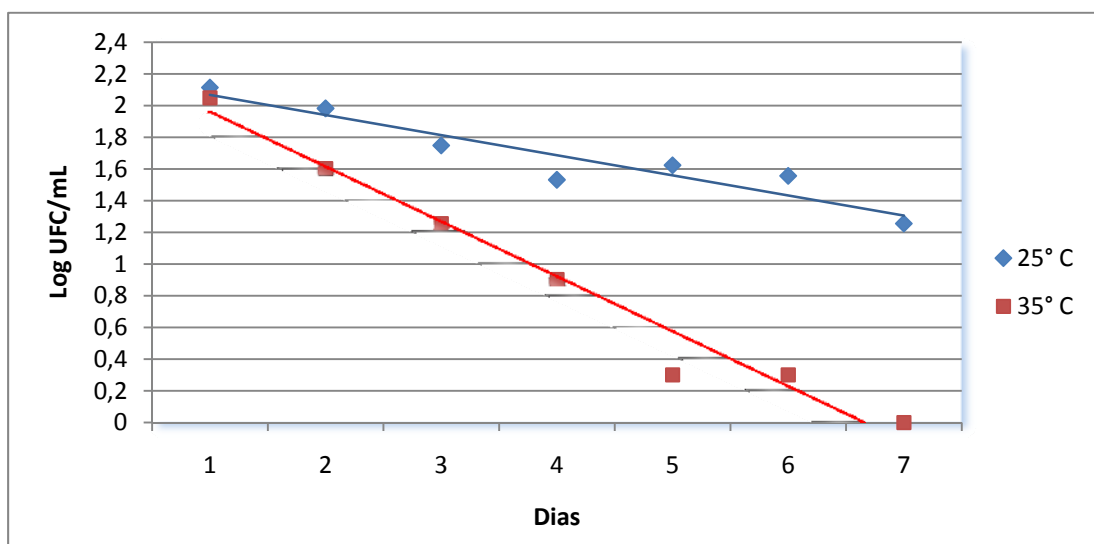
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,518179098), *Superiores* (-0,311450842)

Resultado: Não estável.

**Tabela 43. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C3 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	600	460
2	450	230
3	220	80
4	150	50
5	160	10
6	110	10
7	70	1

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 20. Variação da concentração diária de células do lote C3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,177424861), *Superiores* (-0,076352906)

Resultado: Não estável;

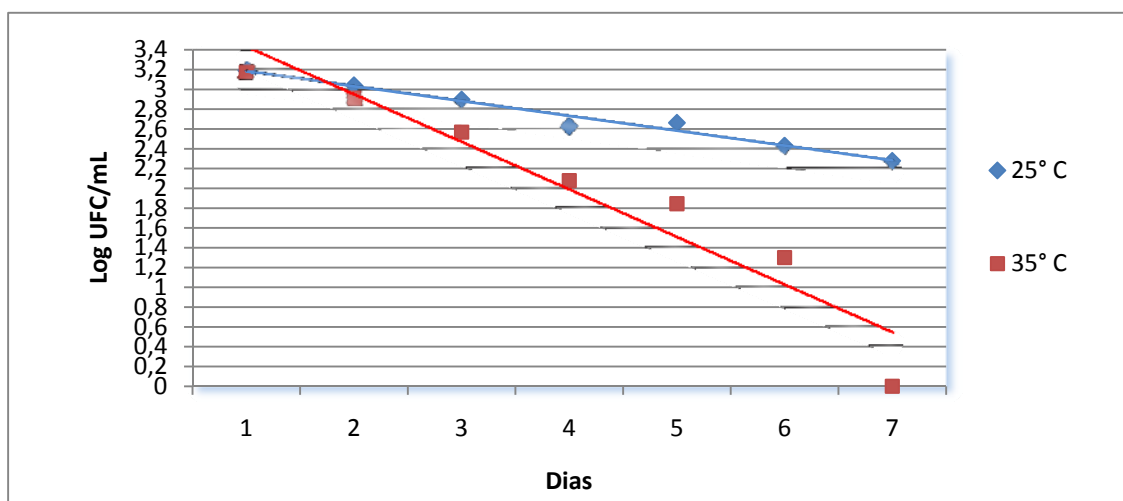
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,41611386), *Superiores* (-0,277025895)

Resultado: Não estável.

**Tabela 44. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote C4 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	1550	1480
2	1100	810
3	790	370
4	420	120
5	460	70
6	270	20
7	190	1

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 21. Variação da concentração diária de células do lote C4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,179385184), *Superiores* (-0,119876345)

Resultado: Não estável;

Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,644991095), *Superiores* (-0,315637396)

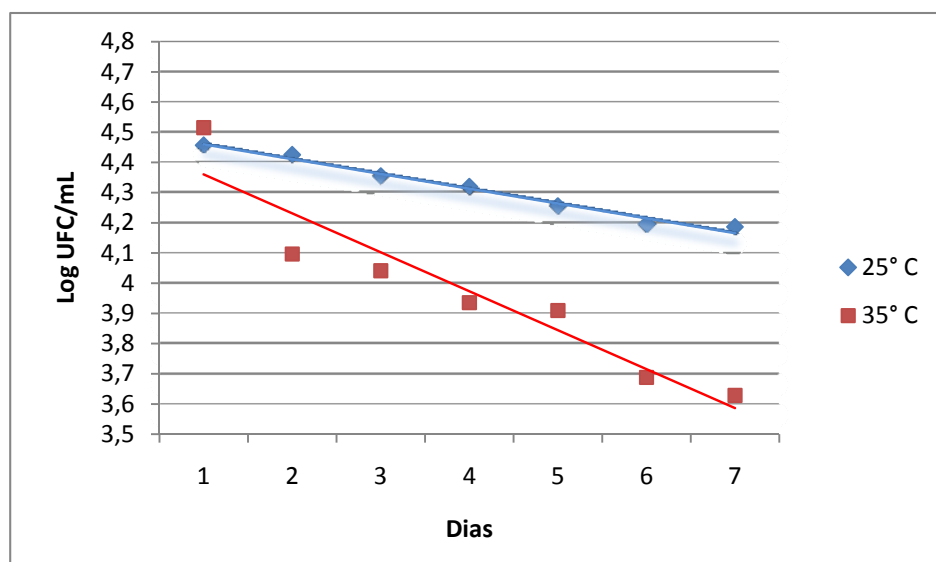
Resultado: Não estável.



**Tabela 45. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC1 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	28625	32750
2	26625	12500
3	22625	11000
4	20875	8625
5	18000	8125
6	15625	4875
7	15375	4250

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 22. Variação da concentração diária de células do lote BC1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,056748400), *Superiores* (-0,041254912)

Resultado: Não estável;

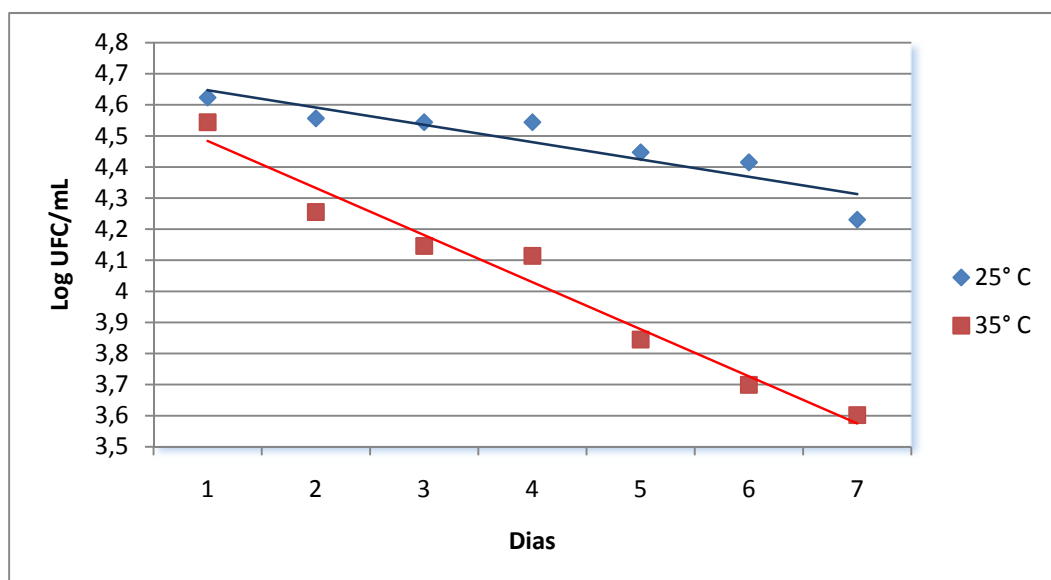
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,179404740), *Superiores* (-0,078445776)

Resultado: Não estável.

**Tabela 46. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC2 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	42000	35000
2	36000	18000
3	35000	14000
4	35000	13000
5	28000	7000
6	26000	5000
7	17000	4000

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 23. Variação da concentração diária de células do lote BC2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,082642911), *Superiores* (-0,028640619)

Resultado: Não estável;

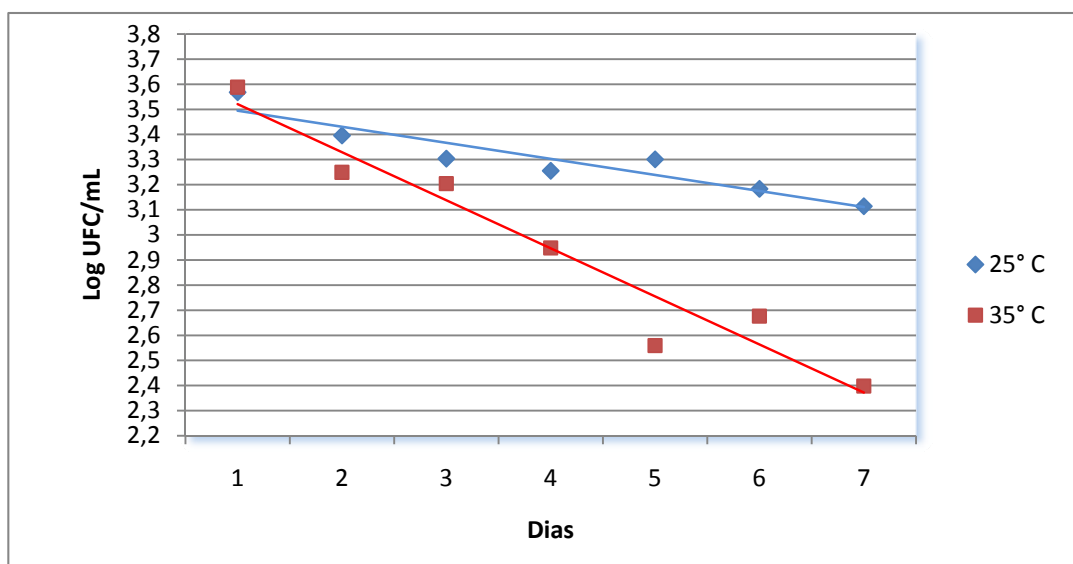
Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,182515844), *Superiores* (-0,120316953)

Resultado: Não estável.

**Tabela 47. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote BC3 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Contagem UFC <sup>a</sup> /mL	
	25°C	35°C
1	3700	3875
2	2487	1775
3	2012	1600
4	1800	887
5	2000	362
6	1525	475
7	1300	250

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 24. Variação da concentração diária de células do lote BC3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C: *Inferiores* (-0,092108836), *Superiores*( -0,0357817)

Resultado: Não estável;

Temperatura de 35°C: *Inferiores* (-0,247746597), *Superiores* (-0,135168871)

Resultado: Não estável.

**Estabilidade diária do lote BC4 – equivalente ao lote BC3**

### 5.13- Resultados do lote SB1

Tabela 48. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB1 em duas diferentes temperaturas de transporte.

Dias	Média das contagens UFC <sup>a</sup> /mL			
	<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus</i>	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1	880	760	13600	10400
2	840	310	12600	12000
3	730	430	12000	10000
4	600	270	13500	5900
5	480	180	12400	5500
6	490	80	11000	6000
7	160	10	11500	3300

UFC – Unidade formadora de colônias

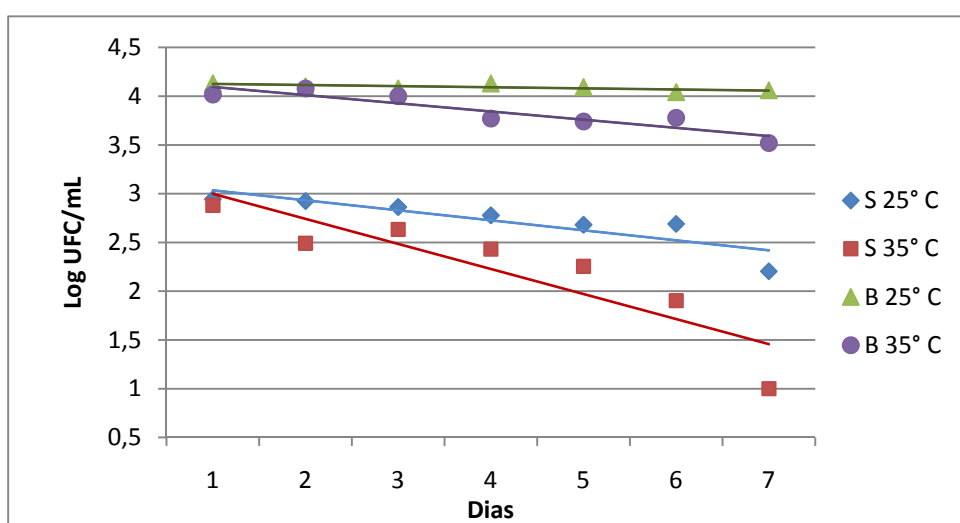


Figura 25. Variação da concentração diária de células do lote SB1 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – *Salmonella* sp. B – *B. cereus*. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).

#### Limites de confiabilidade 95%:

Temperatura de 25°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,167658536), Superiores (-0,0374369)

Resultado: Não estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,023913201), Superiores (0,000896166)

Resultado: Estável.

Temperatura de 35°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,405285376), Superiores (-0,108798919)

Resultado: Não estável;

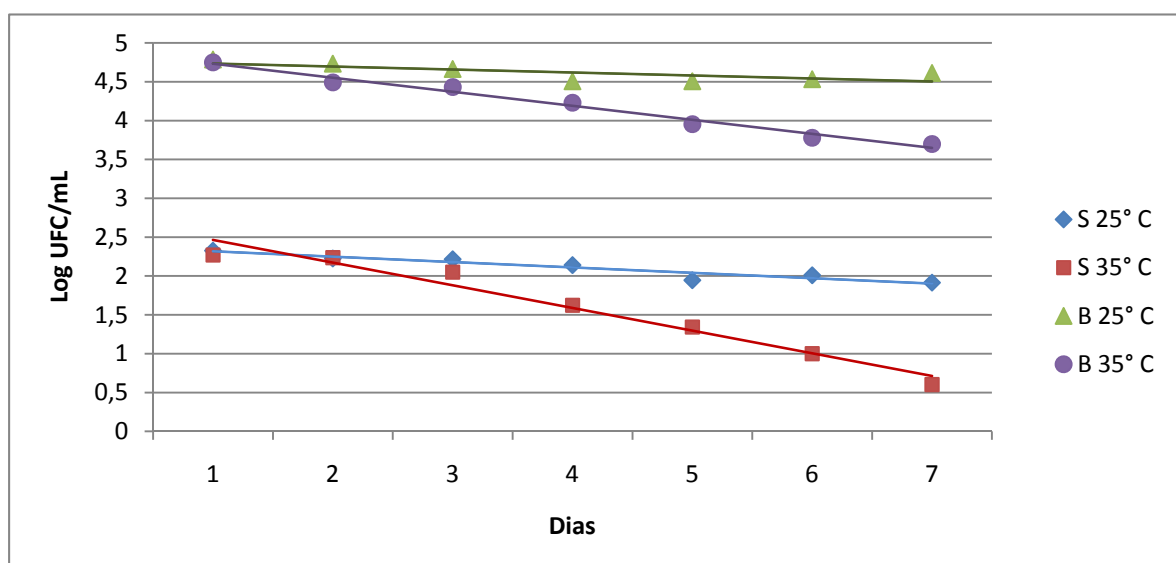
Para *B.cereus*: Inferiores (-0,126259401), Superiores (-0,042115992)

Resultado: Não estável.

**Tabela 49. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB2 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Média das contagens UFC <sup>a</sup> /mL			
	<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus</i>	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1	212	186	61000	56000
2	168	172	54000	31000
3	164	112	46000	27000
4	138	42	32000	17000
5	88	22	32000	9000
6	102	10	34000	6000
7	82	4	41000	5000

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 26. Variação da concentração diária de células do lote SB2 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – *Salmonella* sp.. B – *B. cereus*. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,094620311), Superiores (-0,044047219)

Resultado: Não estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,078895052), Superiores (0,00196109)

Resultado: Estável.

Temperatura de 35°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,35585818), Superiores (-0,228442612)

Resultado: Não estável;

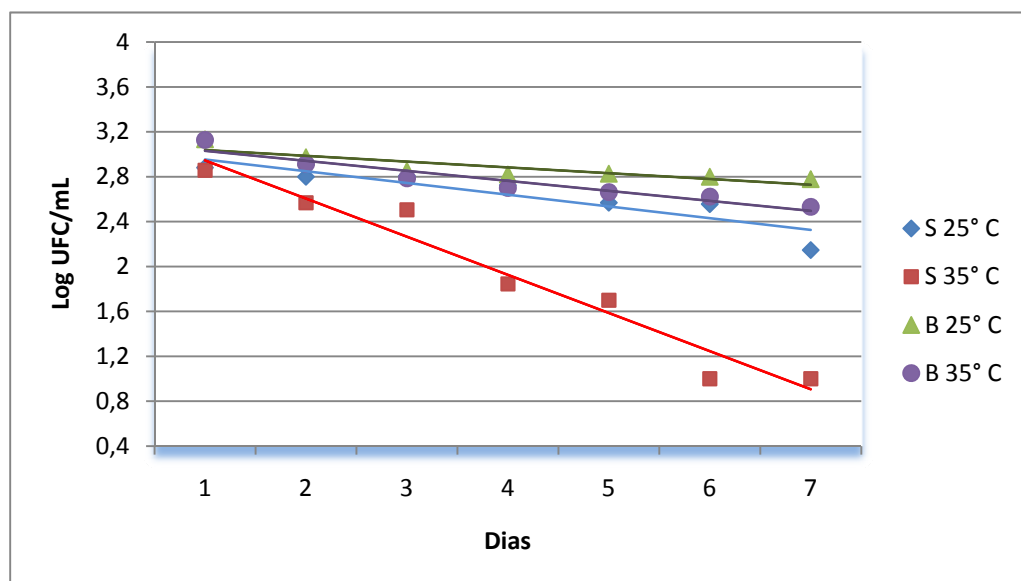
Para *B.cereus*: Inferiores (-0,209025143), Superiores (-0,151774586)

Resultado: Não estável.

**Tabela 50. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB3 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Média das contagens UFC <sup>a</sup> /mL			
	<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus</i>	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1	760	720	1360	1340
2	630	370	940	820
3	640	320	710	610
4	530	70	660	500
5	370	50	670	460
6	360	10	630	420
7	140	10	600	340

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 27. Variação da concentração diária de células do lote SB3 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – *Salmonella* sp. B – *B. cereus*. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,161211593), Superiores (-0,047939193)

Resultado: Não estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,084490715), Superiores (-0,018289365)

Resultado: Não estável;

Temperatura de 35°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,425376379), Superiores (-0,254236544)

Resultado: Não estável;

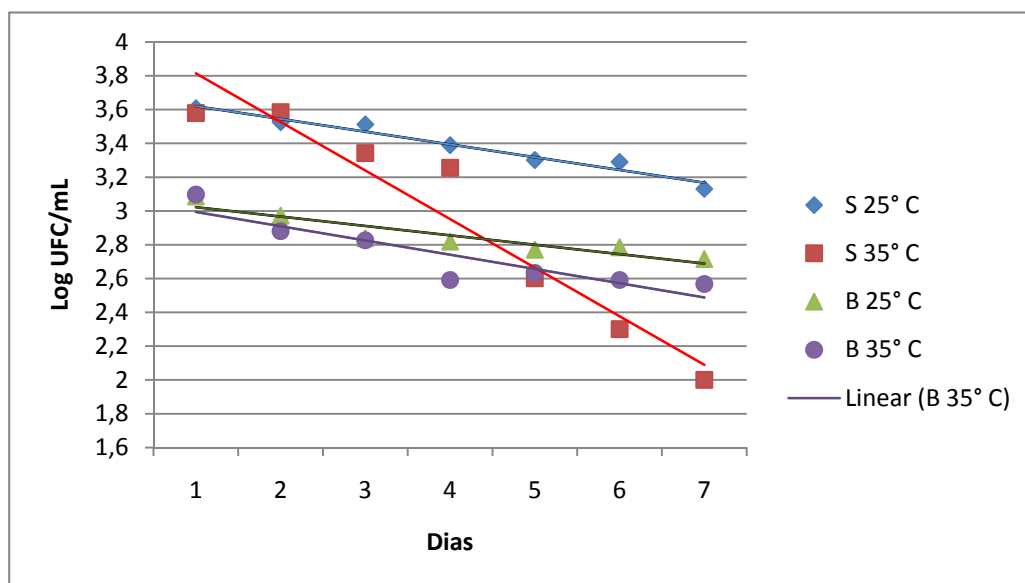
Para *B.cereus*: Inferiores (-0,120849945), Superiores (-0,057048538)

Resultado: Não estável.

**Tabela 51. Estabilidade em curto prazo (transporte) do Lote SB4 em duas diferentes temperaturas de transporte.**

Dias	Média das contagens UFC <sup>a</sup> /mL			
	<i>Salmonella</i>		<i>B.cereus</i>	
	25°C	35°C	25°C	35°C
1	4050	3800	1220	1250
2	3350	3850	940	760
3	3250	2200	690	670
4	2450	1800	660	390
5	2000	400	590	430
6	1950	200	610	390
7	1350	100	520	370

a – Unidade formadora de colônias



**Figura 28. Variação da concentração diária de células do lote SB4 durante simulação de transporte em duas diferentes temperaturas. S – *Salmonella* sp.. B – *B. cereus*. y = concentração de células (Log UFC/mL). x = tempo decorrido (dias).**

**Limites de confiabilidade 95%:**

Temperatura de 25°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,161211593), Superiores (-0,047939193)

Resultado: Não estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,084490715), Superiores (-0,018289365)

Resultado: Não estável;

Temperatura de 35°C:

Para *Salmonella* sp.: Inferiores (-0,425376379), Superiores (-0,254236544)

Resultado: Não estável;

Para *B.cereus*: Inferiores (-0,120849945), Superiores (-0,057048538)

Resultado: Não estável.

## 5.5. Comparação da perda da viabilidade das bactérias estudadas, frente às variações de tempo, nas diferentes temperaturas de estudo.

A partir das médias das contagem dos MR produzidos, foram comparadas as perdas de viabilidade apresentadas por cada microrganismo durante os testes de estabilidade em longo e em curto prazo.

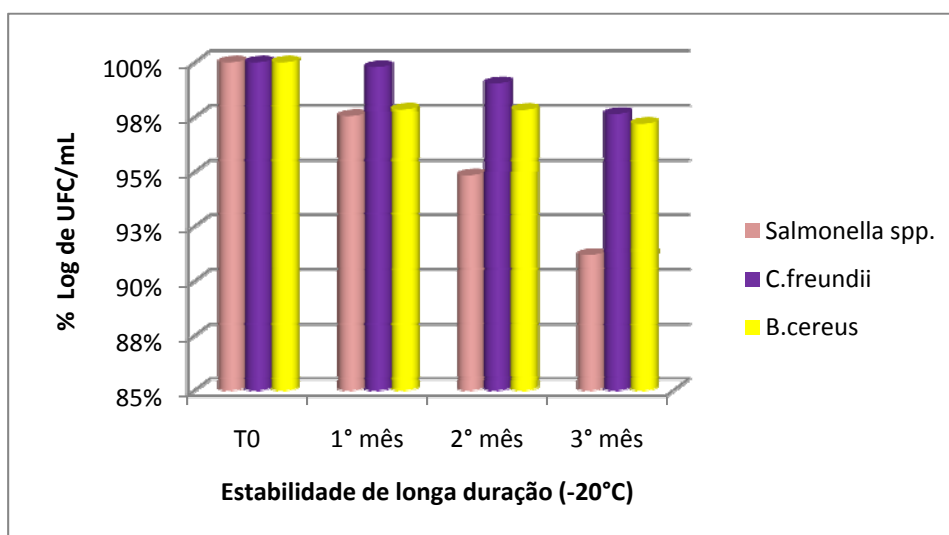
O acompanhamento da perda da viabilidade celular foi realizado através do cálculo da percentagem das médias das contagens em UFC/mL, convertidas em  $\log_{10}$ . Os dados obtidos no teste da homogeneidade foram considerados como o número de células iniciais (100%), no tempo zero do estudo ( $T_0$ ).

Os percentuais de perda de viabilidade em longo prazo dos microrganismos utilizados estão indicados na tabela 52 e na figura 29.

**Tabela 52. Percentuais do  $\log_{10}$  das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em longo prazo.**

Bactérias utilizadas	$T_0$ (%)	1º mês(%)	2º mês(%)	3º mês(%)
<i>Salmonella</i> sp.	100	97,5	94,8	91,1
<i>C.freundii</i>	100	99,7	99,0	97,6
<i>B.cereus</i>	100	97,8	97,8	97,1

$T_0$ . tempo zero do estudo



**Figura 29. Percentual de perda de  $\log_{10}$  das médias de contagem em UFC/mL de *Salmonella* spp, *C. freundii* e *B. cereus*, durante o estudo de estabilidade em longo prazo.**

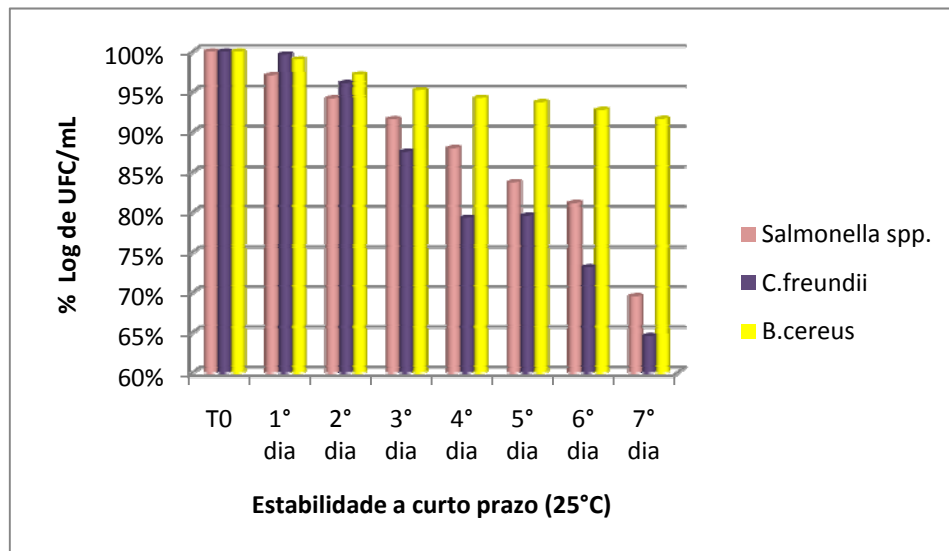


As Tabelas 53 e 54 e as Figuras 30 e 31 resumem os percentuais de perda de viabilidade em curto prazo das bactérias estudadas nas temperaturas de 25°C e 35°C.

**Tabela 53. Percentuais do  $\log_{10}$  das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em curto prazo a 25°C.**

Bactéria utilizada	T <sub>0</sub> (%)	1ºdia (%)	2ºdia (%)	3ºdia (%)	4ºdia (%)	5ºdia (%)	6ºdia (%)	7ºdia (%)
<i>Salmonella</i> sp.	100	97,0	94,1	91,5	87,9	83,7	81,1	69,5
<i>C.freundii</i>	100	99,6	96,0	87,5	79,2	79,5	73,1	64,5
<i>B.cereus</i>	100	99,0	97,1	95,1	94,2	93,6	92,7	91,6

T<sub>0</sub>. tempo zero do estudo

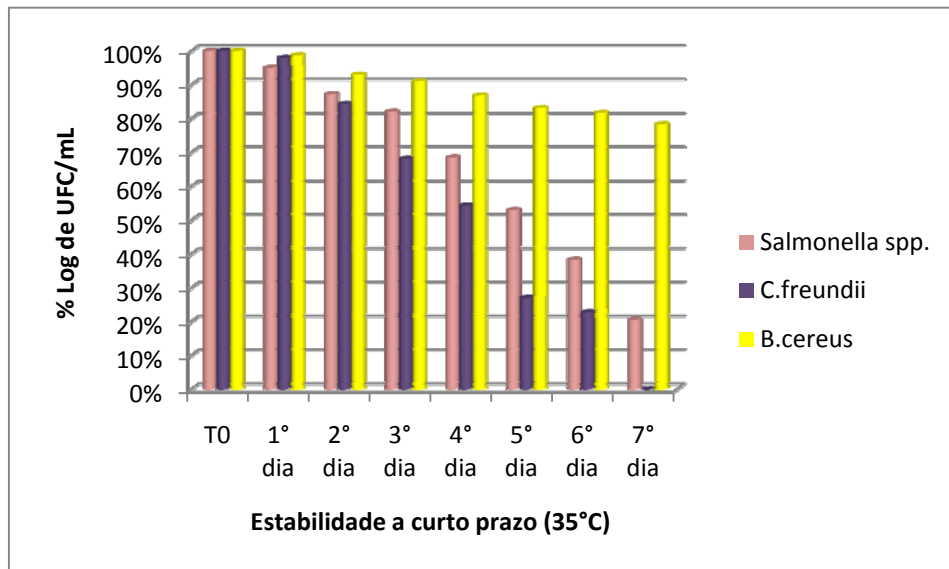


**Figura 30. Percentual de perda de  $\log_{10}$  das médias de contagem em UFC/mL de *Salmonella* spp, *C. freundii* e *B. cereus*, durante o estudo de estabilidade em curto prazo à temperatura de 25°C.**

**Tabela 54. Percentuais do  $\log_{10}$  das médias das contagens de UFC/mL obtidas durante o teste de estabilidade em curto prazo a 35°C.**

Bactéria utilizada	T <sub>0</sub> (%)	1ºdia (%)	2ºdia (%)	3ºdia (%)	4ºdia (%)	5ºdia (%)	6ºdia (%)	7ºdia (%)
<i>Salmonella</i> sp.	100	95,0	87,1	82,0	68,5	52,9	38,2	20,5
<i>C.freundii</i>	100	97,9	84,3	68,1	54,2	26,9	22,7	0
<i>B.cereus</i>	100	98,6	92,9	91,0	86,8	83,1	81,6	78,3

T<sub>0</sub>. tempo zero do estudo



**Figura 31. Percentual de perda de  $\log_{10}$  das médias de contagem em UFC/mL de *Salmonella* spp, *C. freundii* e *B. cereus*, durante o estudo de estabilidade em curto prazo à temperatura de 35°C.**

## 6. DISCUSSÃO

Considerando-se a escassez de informações referentes à produção de MR destinados a EP e a necessidade de se gerar materiais mais acessíveis aos laboratórios públicos e privados, o presente estudo foi realizado buscando-se avaliar a técnica de liofilização no preparo de MR microbiológicos em matriz leite.

As variações nas concentrações de células das bactérias utilizadas foram acompanhadas durante o preparo da suspensão e após o processo de liofilização, como descrito nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. A leitura da transmitância das suspensões de células permitiu o cálculo aproximado da concentração de células a ser obtida após a contaminação da matriz.

Foram também avaliadas as médias das perdas de células nos lotes estudados após o processo de liofilização, como indicado nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. As perdas foram de 78% de  $\log_{10}$  de concentração de células nos lotes de *Salmonella* sp., 84% de  $\log_{10}$  nos lotes de *C. freundii* e de 58% de  $\log_{10}$  nos lotes de *B. cereus*. Nos MR mistos as médias das perdas de concentração de células de *Salmonella* foram de 61% de  $\log_{10}$  e de *B. cereus* de 69% de  $\log_{10}$ . Em concordância com o descrito por Costa & Ferreira (1991), as perdas de viabilidade durante o processo de liofilização variaram consideravelmente entre as bactérias estudadas. Em geral a viabilidade bacteriana após a liofilização decresce na seguinte ordem: bactérias formadoras de esporos, Gram-positivas e Gram-negativas.

Os resultados dos procedimentos utilizados na avaliação da reprodutibilidade da técnica no preparo de dois lotes com uma mesma suspensão de bactérias, descritos na Tabela 5, apontaram dificuldades na obtenção de lotes equivalentes. Dos seis pares de lotes preparados para esta avaliação apenas dois pares foram equivalentes. Esses resultados indicam que a técnica de preparo de diferentes lotes com a mesma suspensão de células não apresentou uma boa reprodutibilidade, considerando nível de significância de 5%.

Os critérios de controle estabelecidos para os MR produzidos objetivaram a manutenção da qualidade e a integridade dos materiais. Com exceção dos testes de homogeneidade e estabilidade, os demais controles não puderam ser comparados com resultados de outros estudos por falta de dados na literatura.

A verificação do vácuo permitiu a eliminação dos frascos que apresentaram resultados insatisfatórios, como indicado na tabela 6. Na maioria dos casos, o mau

posicionamento dos frascos nas estantes dificultou o fechamento de forma adequada favorecendo a entrada de ar após a abertura do liofilizador. Dos 1408 frascos produzidos, apenas 8 (0,57%) apresentaram resultados insatisfatório para leitura do vácuo. Esses resultados indicam a adequação do sistema de fechamento empregado no final do processo de liofilização.

A eficiência da secagem durante os procedimentos de liofilização foi determinada pela análise da umidade residual. Os dados descritos na tabela 7 demonstram que os lotes que apresentaram médias com valores na faixa de 1,0 a 3,0% (FDA, 1990), foram considerados satisfatórios. Dos 16 lotes produzidos, dois lotes (C1 e C2) apresentaram percentagens próximas ao limite mínimo de 1,0%, com valores de 0,97% e 0,98%, respectivamente. Os dois lotes avaliados foram expostos ao mesmo ciclo de liofilização. No entanto, todos os ciclos realizados no estudo obedeceram aos prazos de  $24 \pm 1$  hora, com controle de temperatura abaixo de  $-40^{\circ}\text{C}$  e vácuo menor que  $100\mu\text{Hg}$ . Uma vez que os resultados dos referidos lotes ficaram próximos ao limite mínimo, estes foram mantidos no estudo para serem avaliados nos demais ensaios de controle, onde não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os outros lotes.

A verificação da pureza foi satisfatória para todos os lotes analisados indicando a ausência de contaminação dos MR produzidos, com microrganismos indesejáveis, durante todo o processo de produção do material.

De forma semelhante, as análises para verificação das características fenotípicas indicaram que os microrganismos estudados não apresentaram mudanças nos parâmetros bioquímicos avaliados, após a produção do MR.

Com relação ao teste da homogeneidade, observamos que quanto menor o valor do  $\sigma_p$  atribuído a um material, mais homogêneo este pode ser considerado. Os valores dos  $\sigma_p$  variaram significativamente entre os lotes das diferentes bactérias estudadas. Os menores valores de desvio padrão deste estudo foram atribuídos para os MR contendo *B. cereus* e os maiores para as Enterobactérias estudadas.

Todos os lotes contendo apenas *B. cereus* (Tabelas 16, 17, 18 e 19) apresentaram valores de  $\sigma_p$  muito abaixo dos lotes preparados com os outros microrganismos. Para esses lotes foram padronizados valores de  $\sigma_p$  de 0,10.

Para os lotes S1, S2, S3 e S4 contendo *Salmonella* sp. (Tabelas 8, 9 10 e 11), os valores foram de 0,27, 0,10 a 0,62 e 0,13, e para os lotes contendo *C. freundii* C1,

C2, C3 e C4 (Tabelas 12, 13, 14 e 15), os valores atribuídos foram de 0,39, 0,36, 0,32 e 0,32, respectivamente.

Para os lotes mistos os valores dos  $\sigma_p$  para *Salmonella* sp. e *B. cereus* foram respectivamente de 0,61 e 0,10 para o lote SB1, 0,55 e 0,11 para o SB2, 0,53 e 0,24 para o SB3 e 0,10 e 0,10 para o SB4 (Tabelas 20, 21,22 e 23).

Ao aplicarmos os limites sugeridos por Fearn & Thompson (2001) para a avaliação da precisão do teste da homogeneidade ( $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ ), observamos que todos os lotes preparados com apenas um microrganismo obedeceram à relação citada, sendo, portanto considerados homogêneos (Tabelas 8 a 19). Por outro lado, dentre os lotes mistos, os resultados da homogeneidade não foram considerados satisfatórios, para o lote SB3 no ensaio de *B. cereus* e para o lote SB4 para ambos os ensaios.

A seleção do teste estatístico utilizado neste estudo para a avaliação da homogeneidade foi baseada nas indicações das Normas ISO 43-1 e da ILAC G13:08. A comparação dos resultados obtidos no teste da homogeneidade, com a de outros estudos, foi dificultada pela diversidade de testes estatísticos utilizados para esta avaliação. Peterz e Steneryd (1993) obtiveram resultados satisfatórios para a homogeneidade de MR preparados pela técnica de liofilização ao utilizarem o teste-F. Beckers e colaboradores (1985), In't Veld (1998) e In't Veld e colaboradores (1999) verificaram a homogeneidade dos MR produzidos pela técnica de spray-dryer utilizando a distribuição de "Poison".

As médias das contagens realizadas nos testes de estabilidade em longo prazo apontaram uma pequena queda da viabilidade dos microrganismos estudados no período de estoque. A análise estatística de regressão aplicada aos dados indicou que os MR produzidos se mantiveram estáveis quando estocados por até 3 meses à temperatura de -20°C (Tabelas 24 a 37, Figuras 1 a 14). De forma semelhante, Janning e colaboradores (1995) descreveram a temperatura de -20°C como adequada para o estoque de MRC produzidos pelo *National Institute of Public Health and Environmental Protection*. Dentre os MRC estudados foram citados um MRC contendo *S. Typhimurium* e outro contendo *B. cereus*. Esses MRC foram estocados a -20°C por períodos de 4 anos sem apresentarem perdas expressivas na viabilidade das células.

Ao avaliarmos a tabela 52 e a figura 29, que indicam os percentuais de perda de viabilidade das bactérias estudadas, durante o estoque a -20°C observamos que a

bactéria *C. freundii* apresentou o menor índice de perda (2,4%), seguido do *B. cereus* (2,9%) e da *Salmonella* sp., cujas perdas foram de 8,9%.

Beckers et al. (1985) avaliaram a estabilidade de um MR contendo *S. Typhimurium* e *S. Panama* preparado pela técnica de spray-dryer, quando estocados a temperatura de 4°C e a temperatura ambiente. Os autores observaram que o MR se manteve estável a 4°C, entretanto apresentou diminuição da estabilidade quando estocado a temperatura ambiente.

Com vistas a aumentar a estabilidade dos MR preparados por spray-dryer, In't Veld (1998) realizou um estudo com três diferentes MR contendo *L. monocytogenes*, *Enterobacter cloacae* e esporos de *B. cereus*, respectivamente. Os resultados mostraram que uma melhora na estabilidade do material pôde ser obtida, quando os LPAC foram estocados a temperaturas baixas, antes da produção do MR final. O tempo e a temperatura de estoque variaram entre as diferentes espécies estudadas. Para MR contendo esporos de *B. cereus* a estocagem a baixas temperaturas não indicou melhora na estabilidade. Já para *L. monocytogenes* e *E. cloacae* o aumento da estabilidade pode ser obtido com o estoque do LPAC por 2 anos a temperatura de 5°C. Como o tempo do presente estudo foi curto, não foi possível realizar esta avaliação.

Os MR apresentaram acentuadas quedas nas médias de contagem, quando avaliados no teste de estabilidade em curto prazo. O estudo simulou o transporte dos MR durante um EP. A análise estatística de regressão aplicada aos dados obtidos mostrou que a exposição dos MR às temperaturas de 25°C e 35°C afetou significativamente a viabilidade dos microrganismos. Como indicado nas Tabelas 38 a 51 e Figuras 15 a 28, com exceção dos lotes SB1 e SB2 que apresentaram estabilidade para *B. cereus* a temperatura de 25°C, todos os outros MR foram classificados como não estáveis nas temperaturas de 25°C e 35°C.

As Tabelas 53 e 54, assim como as Figuras 30 e 31, mostram o percentual das médias das contagens obtidas no teste de estabilidade em curto prazo para as diferentes bactérias estudadas. Os dados indicaram uma diminuição expressiva no número de células de *Salmonella* sp. e de *C. freundii* no terceiro dia de transporte a 25°C, com percentuais das médias de perda de 9% e 12% respectivamente. Na temperatura de 35°C as perdas foram acentuadas já no segundo dia, com percentuais de 13% para *Salmonella* sp. e 12% para *C. freundii*.

As médias de perdas observadas nos MR após o 7º dia a 25°C para o *B. cereus* foram de 8,4%. Para o *C. freundii* e para a *Salmonella* sp. as perdas foram de 35,5% e 30,5%, respectivamente. Apesar da aparente estabilidade dos lotes de *B. cereus* a 25°C, indicado na tabela 53 e figura 30, todos os lotes desta bactéria foram considerados instáveis na avaliação estatística aplicada aos resultados de contagem.

Já a 35°C, as perdas após o 7º dia foram de 100% para o *C. freundii*, acompanhada de 79,5% para *Salmonella* sp. e de 21,7% para *B. cereus*.

In't Veld (1998) avaliou, semanalmente, a estabilidade de MR contendo *S. Panama*, preparado pela técnica de spray-dryer mantido nas temperaturas de 22°C, 30°C e 37°C, durante 35 dias. O autor indicou redução percentual da concentração de células, na primeira semana, de 2,5% para o MR mantido a 22°C; de 9,7%, a 30°C e de 16,2%, a 37°C. In't Veld e colaboradores (1996) indicaram queda na viabilidade celular de *S. Typhimurium* a 22°C, 30°C e 37°C, durante estudo de certificação do MR. O estudo teve duração de 28 dias, com a avaliação realizada a cada sete dias. Os percentuais de perda corresponderam a 23,7%, 11,8% e 12,0%, respectivamente. As temperaturas descritas nos dois trabalhos são próximas e não iguais. Apesar disso, comparamos os nossos dados com os obtidos nos estudos citados e concluímos que as médias de perdas apresentadas pelos MR contendo *Salmonella* sp., preparados por liofilização no nosso estudo foram bem mais elevadas (30% e 80%, respectivamente) que as observadas nos MR preparados pela técnica de spray-dryer. Tais resultados sugerem a possibilidade de MR produzidos por spray-dryer serem mais estáveis nas faixas de temperatura estudadas, que os MR produzidos pela técnica de liofilização.

In't Veld e colaboradores (1999) descreveram a obtenção de MR estáveis, preparados por spray-dryer para enumeração de *B. cereus*, utilizando esporos da bactéria. A estabilidade foi testada a 22°C, 30°C e 37°C, por um período de 4 semanas. Os resultados do teste indicaram perda significativa no número de UFC apenas a 37°C, indicando maior estabilidade que o MR preparado no presente estudo com células vegetativas.

Considerando que MR produzidos para EP devem seguir requisitos de homogeneidade e estabilidade, os materiais produzidos neste estudo poderiam ser utilizados em um possível EP, em condições que assegurassem aos participantes o recebimento de MR com semelhantes concentrações de células.

Para a utilização dos lotes de MR destinados ao ensaio de enumeração de *B. cereus*, destacamos a necessidade de transporte dos materiais a -20°C, uma vez que os estudos de estabilidade em curto prazo indicaram perdas nas concentrações de células durante o transporte a 25°C e a 35°C. Como podemos observar nas Figuras 22, 23 e 24, as perdas foram acentuadas diariamente. O envio desses materiais, a temperatura ambiente, para laboratórios localizados em diferentes regiões do país, possivelmente acarretaria no recebimento de MR com diferentes concentrações de células, o que comprometeria a correta avaliação dos resultados. Entretanto, o transporte de material a baixas temperaturas é uma prática complicada e de custo bastante elevado.

Por outro lado, os analitos contendo *Salmonella* sp. e *C. freundii* produzidos neste estudo poderiam ser transportados a -20°C ou a 25°C. As Tabelas 38 a 44 apresentam resultados das contagens dos diferentes lotes dos analitos citados no estudo da estabilidade em curto prazo a 25°C. As contagens foram realizadas com 1 mL do material reconstituído. A menor concentração detectada entre os lotes de *Salmonella* sp. foi de 12 UFC/mL e de 14 UFC/mL entre os lotes de *C. freundii*. No entanto, para a utilização segura desses materiais a 25°C seria necessário um estudo do limite mínimo de detecção (LMD), para cada uma das bactérias citadas, utilizando diferentes metodologias de detecção de *Salmonella* sp. Sendo assim, após a obtenção dos resultados se estabeleceria uma concentração mínima permitida. O MR seria considerado apropriado para ser utilizado, ao apresentar um valor igual ou maior que a concentração mínima estabelecida no 7º dia de estudo.

Na literatura estão descritos estudos de avaliação do LMD de *Salmonella* sp. em alimentos utilizando diferentes metodologias de enriquecimento. Segundo Bricio (2004) o LMD encontrado utilizando metodologia do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi igual a 12 UFC/25 g de alimento. Nunes (2006) ao estudar o LMD com culturas de *Salmonella* em caldo BHI utilizando metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) encontrou valores de LMD variando entre 1 a 8 UFC/25 mL.

Uma alternativa para obtenção de melhores resultados de estabilidade de MR para ensaio de detecção de *Salmonella* sp., ou para outros ensaios qualitativos, seria o preparo dos materiais em concentrações mais elevadas que os MR do nosso estudo. Após o sétimo dia de teste de estabilidade de transporte, as concentrações



finais estariam mais elevadas que nos experimentos realizados com MR em baixas concentrações, entretanto atendendo ao limite de concentração estabelecido.

Ao avaliarmos as taxas de viabilidade das bactérias frente às temperaturas estudadas nos testes de estabilidade, 25°C e 35°C, identificamos diferentes percentuais de perda. Essas informações, juntamente com os dados de controle da concentração de células descritos nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, proporcionam o entendimento do comportamento destes microrganismos durante os procedimentos de produção e controle, possibilitando a determinação adequada das faixas de concentração destas bactérias no preparo de MR futuros.

Os resultados encontrados nos estudos de estabilidade sugerem que entre as bactérias estudadas, o *B. cereus* apresentou maior habilidade em resistir às variações ocorridas durante a dessecação, congelamento e temperaturas de transporte. Entretanto, devem ser avaliados outros procedimentos que proporcionem melhor sobrevivência das células bacterianas a essas variações, como o preparo de MR com esporos bacterianos, citado por In't Veld e colaboradores (1999).

Segundo Miyamoto-Shinihara e colaboradores (2007), a capacidade de sobreviver às condições de congelamento rápido e de dessecação está relacionada às diferenças estruturais da parede celular e da membrana dos microrganismos. Bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptídioglicano com espessura variando entre 5 a 10 nm, enquanto nas Gram-positivas a espessura da camada varia de 20 a 80 nm. A fina camada de peptídioglicano das bactérias Gram-negativas apresenta grande tendência de ruptura durante os processos de dessecação e de reidratação.

A literatura específica para dessecação e preservação de microrganismos aborda cuidados especiais para o aumento da viabilidade das células após esses processos. Particular atenção tem sido dada ao estudo das matrizes utilizadas nos processos de dessecação, com vistas a aumentar a viabilidade das células bacterianas dessecadas (MORGAN et al., 2006). Agentes protetores, específicos para diferentes microrganismos, podem ser adicionados durante o crescimento do organismo, ou antes dos processos de congelamento e liofilização (HUBALEK, 2003). Segundo Carvalho e colaboradores (2004), a suplementação do leite desnatado com agentes protetores pode aumentar o efeito crioprotetor do leite sobre o microrganismo dessecado. Muitos compostos são utilizados com a função de proteger as células durante a dessecação. Três categorias podem ser identificadas: substâncias com penetração na parede celular e no citoplasma, podendo citar o dimetilsulfoxi e glicerol; substâncias com penetração

na parede celular, mas não na membrana, como oligossacarídeos, aminoácidos e polímeros de baixo peso molecular e as que não penetram ou que não interagem com a parede celular, ou com a membrana, como proteínas e polissacarídeos (CARVALHO et al, 2004; HUBÁLEK, 2003). Diferentes propriedades de ação resultam em distintas características de proteção. Compostos permeáveis promovem maior permeabilidade na célula, evitam o excesso de desidratação, reduzem a toxicidade dos sais e previnem a formação de cristais dentro da célula durante o congelamento. Os semi-permeáveis se concentram entre a membrana citoplasmática e a parede celular formando uma camada que evita a formação de cristais de gelo e conferem proteção mecânica à membrana. Os não permeáveis são adsorvidos na superfície dos microrganismos formando uma camada viscosa que inibe a formação de cristais de gelo, mas que mantêm uma estrutura amorfa de gelo em proximidade com a célula (CARVALHO et al, 2004).

O grande problema encontrado nos estudos relacionados à dessecação de bactérias é a falta de teorias genéricas que possam ser utilizadas para todos esses microrganismos.

Novos estudos são necessários para a obtenção de MR mais estáveis às variações ocorridas nos processos de dessecação. Importância deve ser dada não somente a adição de agentes protetores à matriz, mas também a outras formas que possam induzir a tolerância das células bacterianas aos processos de congelamento e dessecação.

## 7. CONCLUSÕES

- A técnica de liofilização se mostrou adequada como processo de dessecação para os MR produzidos. Os resultados obtidos nos controles do vácuo e da umidade residual comprovaram que as condições de dessecação empregadas no preparo dos materiais foram satisfatórias.
- A dificuldade da obtenção de lotes equivalentes durante o preparo dos lotes de MR com a mesma concentração de células indicou que a técnica de preparo utilizada não apresentou uma boa reprodutividade para este procedimento. Fato que pode ser explicado pela dificuldade da dispersão precisa de células durante as diferentes etapas de preparo dos lotes.
- Apesar do caráter preliminar de algumas análises de controle realizadas, como verificação do vácuo, determinação da umidade residual e verificação da pureza, os resultados obtidos foram de grande importância na avaliação dos procedimentos de produção e na verificação da qualidade dos MR.
- Os resultados satisfatórios obtidos no controle da pureza dos lotes analisados mostraram que os procedimentos empregados durante a produção dos MR não ofereceram riscos de contaminação aos materiais produzidos.
- *B. cereus* apresentou, em média, maior resistência às condições de dessecação e estoque do que *Salmonella* sp. e *C. freundii*.
- Os resultados obtidos sugerem que MR preparados com apenas um microrganismo apresentam melhores características de homogeneidade e estabilidade que os materiais mistos.
- Os resultados do teste da estabilidade em longo prazo mostraram que a temperatura de -20°C foi adequada para a manutenção dos MR produzidos.

- Os resultados da avaliação da estabilidade dos MR de *B. cereus*, em curto prazo, indicaram que estes lotes destinados a ensaios quantitativos, só poderiam ser utilizados em EP se fossem obrigatoriamente transportados a -20°C.

- Os lotes dos MR contendo *Salmonella* sp. e *C. freundii* poderiam ser transportados a 25°C. No entanto, para a utilização segura desses materiais nesta temperatura, seria necessário o estabelecimento de uma concentração de células após a realização de estudos do LMD para cada uma das bactérias citadas.

- A produção de novos lotes de MR contendo *Salmonella* sp. e *C. freundii* em concentrações mais elevadas que os desenvolvidos neste estudo propiciariam transporte a temperaturas mais elevadas que 25°C, desde que após o 7º dia de estudo apresentasse valores acima de um limite de concentração estabelecido para aceitação desses materiais.

- Os intervalos de avaliação da estabilidade em longo prazo de MR a serem utilizados em EP devem ser estabelecidos de acordo com o período de produção e de controle analítico do material. Entretanto, o tempo necessário para a organização e execução de um possível EP deve também ser considerado.

## 8. PERSPECTIVAS

Tendo em vista a importância e a necessidade da produção de MR mais homogêneos e mais estáveis, faz-se necessário:

- Avaliar a matriz leite suplementada com aditivos, com vistas à obtenção de MR mais estáveis a temperaturas acima de -20°C.

- Produzir MR com outras bactérias de importância em microbiologia de alimentos utilizando matriz leite.

- Desenvolver MR para EP em microbiologia de alimentos utilizando matrizes diferentes da estudada.

- Avaliar a produção de MR com volumes de matrizes mais adequados para ensaios em microbiologia de alimentos, como por exemplo 10 e 25 g.
- Ampliar o estudo da estabilidade em curto prazo, avaliando novas temperaturas superiores a  $-20^{\circ}\text{C}$  e inferiores a  $25^{\circ}\text{C}$ , a fim de determinar uma temperatura máxima que garanta a estabilidade dos materiais durante o transporte.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, S.L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae*. In: MURRAY et al., **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington, DC: ASM Press, 2007, v.1.

ANDREWS, W.H.; HAMMACKS, T.S. *Salmonella*. In: **Bacteriological analytical manual Online**. [S.l.]; FDA, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 3 set. 2007.

ARAUJO, E.; PACHECO, M.A.S.R.; BONI, R.F.; FONSECA, Y.S.K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar**, v.9(40), p.24-26, 1995.

AUGUSTIN, J.C.; CARLIER, V. French laboratory proficiency testing program for food microbiology. **Journal of AOAC International**, v.85, n.4, p.952-959, 2002.

AUGUSTIN, J.C.; CARLIER, V. Lessons from organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. **Food Microbiology**, v.23, p.1-38, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 2 ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2003.

BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001, 676p.

BECKERS, H.J.; VAN LESDEN, F.M.; MEIJSSSEN, M.J.M.; KAMPELMACHER, E.H. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of

Salmonella in food and feeding stuffs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.59, p.507-512, 1985.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. **Relatório situacional dos Lacens-2005** (Ano-base 2004). Brasília, DF, 2006. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/reblas/lacens/relatorio\\_2005.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/lacens/relatorio_2005.pdf). Acesso em: 17 set. 2007.

BRASIL, Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] república Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de Set. 1990.

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**, Brasília, n.7-E, p.45, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRICIO, S.M.L. **Avaliação da Qualidade Microbiológica de Salpicão de Frango e Salada de Maionese com Ovos Servidos em Restaurantes Self-service da Cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2004. 100p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). – Centro de Tecnologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

CAMARGO, T.S.P. **Proposta de Integração das Normas ISO/IEC 17025 e BPL a um Software de Gerenciamento e Controle Laboratorial**. Minas Gerais: UNIFEI, 2006, 16P. Monografia (Graduação em Engenharia de Produção e Gestão) – Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 2006.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM, F. Microbiologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718p.

CARDOSO, M.H.W.M. **Preparação de um Material de Referência Certificado para Controle de Agrotóxicos em Hortifrutigranjeiros**. Rio de Janeiro:

INCQS/FIOCRUZ, 2008, 191p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro, 2008.

CARMO, G.M.I. Vigilância Epidemiológica de Surtos de DTA. SVS/MS, 2007. Seminário apresentado no INCQS/FIOCRUZ em Outubro de 2008.

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.

CDC – Division of foodborn bacterial and mycotic diseases (DFBMD). Disponível em [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/salmonellosis\\_gi.html#1](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html#1). Acesso em: 21 dez. 2008.

COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v.22(3), p.263-268, 1991.

D'AOUST, J.Y.; MAUER, J., BAILEY, J.S. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**, 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2001, 872p.

DETERMINAÇÃO de Umidade Residual por Gravimetria em Vacinas Liofilizadas. Rev. 03. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. Seção 4,3. 5p. (65.3130.001).

DVEYRIN, Z.; BEN-DAV, H.; MATES, A. Proficiency testing as tool for ISO 17025 implementation in national public health laboratory: a mean for improving efficiency. **Accreditation and Quality Assurance**, v.6, p.190-194, 2001.

EMONS, H.; FAJGELJ, A.; VAN DER VEEN, A.M.H.; WATTERS,R. New definitions on reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, p.576-578, 2006.



EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - formerly list of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN). Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/>. Acesso em: 17 jan. 2009.

FARMER, J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; MCWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G.P.; ASBURY, M.A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H.G.; ELIAS, C.; FANNING, G.R. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v.21, p.46-76, 1985.

FDA - Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products. 1990. U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Cber/gdlns/moisture.htm>>. Acesso em: 17 Nov. 2008.

FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for 'sufficient homogeneity'. **Analyst**, v.126, p.1414-1417, 2001.

FEPAS Food Microbiology – food examination performance assessment scheme. Disponível em: <<http://www.fapas.com/fepas.cfm>>. Acesso em: 14 março 2009.

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Medicina tropical de São Paulo**, v.45, n.2, p.59-63, 2003.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 182p.

GOMES, L.P.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, G.; BARONI, F.A.; SOUZA, M.M.S. *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos Municípios de Seropédica e Itaguaí – RJ. **Revista da Universidade Rural**, v.24, n.2, p.103-106, 2004.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**, 2. ed. Washington, DC: ASM Press, 2001, 872p.

GRANUM, P.E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS-Microbiology Letters**, v.157(2), p.223-228, 2006.

HAYES, D. Quality assurance in the microbiology laboratory. **Accreditation and Quality Assurance**, v.1, p.18-23, 1996.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

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

ICMSF. Micro-organisms in foods – Microbial ecology of food commodities. 2 ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. 763p.

ICMSF. Micro-organisms in foods - Characteristics of microbial pathogens. 1 ed. London: Black Academic & Professional., 1996. 513p.

ILAC-G 13:08/2007. Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes. ILAC, 2007. 35p.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). **Oficina Sobre Ensaio de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil**, II. Rio de Janeiro 15 a 16 de abril de 2008. Relatório. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. 15p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO 13528. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.** 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO 21528-2. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method.** 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO GUIDE 35. **Reference Materials – General and statistical principles for certification.** 2006.

IN'T Veld, P. H. et al. The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology.** v.80, p.496-504, 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, n.1, p.35-41, 1998.

IN'T Veld, P.H.; Havelaar, A.H.; Van Strijp-Lockfeer, N.G.W.M. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Bacteriology,** v.86, p.266-274, 1999.

IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, B.C.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phago tipo 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública,** v.38, n.3, p.193-196, 1996.

JANNING, B.; VELD, P.H.I.; MOOIJMAN, K.A.; HAVELAAR, A.H. Development, production and certification of microbiological reference materials. **Fresenius Journal Analytical Chemistry,** v.352, p.240-245, 1995.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, p.127-131,1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, Jr., W.C.W. **Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infection. **Microbes and Infection**, v.2(2), p.189-198, 2000.

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

LECLERCQ, A. Development of a standard for the organization of the interlaboratory comparisons in microbiology of food. **Accred Qual Assur**, v.11, p.367-369, 2006.

LINCX - Serviços de Saúde. Disponível em: [http://www.lincx.com.br/lincx/saude\\_a\\_z/alimentos/leite\\_vaca.asp](http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/alimentos/leite_vaca.asp). Acesso em 20 dez. 2008.

LOPES, A.F. Métodos estatísticos aplicados a programas interlaboratoriais e à certificação de materiais de referência. Rio de Janeiro: REDETEC, 2007. 81p.

LUCCHESI, G. **Globalização e Regulação Sanitária: os Rumos da Vigilância Sanitária no Brasil**, Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ, 2001. 320 p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária). Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo CRUZ, Rio de Janeiro.

LUCCHESI, G. A Vigilância sanitária no Sistema Único de Saúde. In: Conferência Nacional de Vigilância Sanitária: caderno de textos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001. Eixo II – texto 5, p. 53-69.

MARGARIDO, M.A. Produtos lácteos: algumas considerações nutricionais e econômicas. In: Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/index.php>>. Acesso em: 03 jan. 2009.

MC KNIGHT, I.C.S.; LEITÃO, M.F.F.; LEITÃO, R.F.F. *Bacillus cereus* em macarrões industrializados. II Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para o consumo. **Revista de Microbiologia**, v.21(3), p.268-275, 1990.

MEAD, P.S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L.F.; Bresee, J.S.; Shapiro, C.; Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. Food-related illness and death in the united states. **Emerging Infectious Diseases**, v.5(5), p.607-625, 1999.

MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L.A.; RODRIGUE, D.; BRENNER, F.H.; BLAKE, P.; TRAUZE, R.V. Outbreaks of *Salmonella* enteritidis infection in United States, 1985-1991. **Journal of Infection Diseases**, v.169(3), p.547-552, 1994.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; SUKENOBE, J.; IMAIZUMI, T.; NAKAHARA, T.. Survival of freeze-dried bacteria. **Journal of General Applied Microbiology**, v.54, p.9-24, 2008.

MOLBAK, K.; BAGGESEN, D.L.; AARESTRUP, F.M.; EBBESEN, J.M., ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A.M.; WEGENER, H.C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella* Enterica serotype Typhimurium DT104. **The New England Journal of Medicine**. v.341, n.19, p.1420-1425, 1999.

MOORE, D.S. A Estatística Básica e Sua Prática. 3.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 658p.

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

MOTA, C.C.S.; VIEIRA, H.R.A.; PUZYNA, I.P.; KALACHE, J.; KONOLSAISEN, J.F.; CAMARGO, N.J. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em Curitiba-Pr, Brasil/julho de 1981. **Higiene Alimentar**, v.2, p. 123-131, 1983.

NBR ISO/GUIA 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência. **ISO GUIA 30**. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. 7p.

NBR ISO/IEC GUIA 43-1. Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais-Parte 1 - Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. **ISO GUIA 43-1**. Rio de Janeiro: ABNT, 1999. 17p.

NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. **ISO GUIA 17025**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.

NUNES, F.F.V. Limite Mínimo de Detecção de Métodos de Análise de *Salmonella sp.* para Alimentos: Uma Contribuição Metodológica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

OLSEN, S.J.; BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, R.V.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: Trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997. **The Journal of Infection Disease**, v.183, p.753-761, 2001.

PEP/SENAI - Programa de Ensaio de Proficiência. Disponível em: <[http://www. pepmb@sc.senai.br](http://www.pepmb@sc.senai.br)>. Acesso em: 14 março 2009.

PERESI, J.T.M., Almeida, I.A.Z.C.; Lima, S.I.; Marques, D.F.; Rodrigues, E.C.A.; Fernandes, S.A.; Gelli, D.S.; Irino, K. Surtos de enfermidades transmitidas por

alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, p.477-483, 1998.

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

PETERZ, M; NORBERG, P. Freeze dried mixed cultures as samples for proficiency tests and collaborative studies in food microbiology. **Journal Assoc. off Anal. Chem.**, v.66(6), p.1510-1513, 1983.

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.

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, p.134-138, 2007.

POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-white scheme. **Research in Microbiology**, v.155, p. 568-570, 2004.

POPPE, C.; SMART, N.; KHAKHRIA, R.; JOHNSON, W.; SPIKA, J.; PRESCOTT, J. *Salmonella Typhimurium* DT 104: A virulent and drug-resistant pathogen. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, p. 559-565, 1998.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiological Reviews**, v.58, n.4, p. 755-805, 1994.

PRODUÇÃO e Preservação pelo Método de Liofilização de Bactérias da Coleção de Culturas. Rev. 03. In: **MANUAL da Qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. Seção 10. 14p. (65.3230.001).

QMS – Microbiology Proficiency Testing Scheme. Disponível em: <[http://www.biotrading.com/en/site/proficiency\\_testing#microbiology](http://www.biotrading.com/en/site/proficiency_testing#microbiology)>. Acesso em: 14 março 2009.

RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problem. **Microbes and Infection**, v.3(3), p. 237-247, 2001.

REZENDE-LAGO, N.C.M. et al. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V.59(6), p.1563-1569, 2007.

RHODEHAMEL, E.J. and HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: **Bacteriological analytical manual Online**. [S.l.]; FDA, 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html>>. Acesso em: 08 jun. 2007.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001, 676p.

ROBERTS, D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. **Arh Hig Rada Toksikol Journal**, v.50, n.1, p 55-65, 1999.

ROSENGREN, A.; HENERYD, A.C. Proficiency testing schemes – their role in quality assurance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p.55, 1998.

SANTOS, L.R.; Nascimento, V.P.N.; Oliveira, S.D.; Rodrigues,D.P.; Reis, E.M.F.R.; Seki, L.M.; Ribeiro, A.R.; FERNANDES, S.A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, n.1, p.01-04, 2003.

SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v.68(3), p. 636-648, 2005.



SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p. 2959-2965, 2004.

SILVEIRA, L.C. **Ciência, Tecnologia, Inovação e Vigilância Sanitária**. Brasília – Distrito Federal: UNB, 2006, 105 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) - **Universidade de Brasília, Brasília, 2006**.

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

TINDALL, B.J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZÉBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.55, p.521-524, 2005.

VOETSCH, A.C. et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infection in the United States. **Clinical Infection Diseases**, v.38(3), p.127-134, 2004.

## ANEXO 1. MEIOS DE CULTURA

### A.1 – Ágar glicose bile vermelho violeta (VRBG)

Extrato de levedura.....	2,4 g
Peptona.....	5,6 g
Cloreto de sódio.....	4,0 g
Sais de bile.....	1,2 g
Glicose.....	8,0 g
Vermelho neutro.....	0,024 g
Cristal violeta.....	0,016 g
Ágar.....	9,6 g
Água purificada.....	800 mL

Suspender os ingredientes em água purificada. Aquecer sob agitação, até a fervura para a completa dissolução. Evitar a fervura do meio por mais de dois minutos. Não autoclavar.

Após o preparo, manter o meio fundido em banho termostático a 49°C. Preferencialmente, utilizar o meio no dia do preparo. Caso não seja possível, evitar que este seja re aquecido mais de uma vez.

pH final:  $7,3 \pm 0,2$  a 25°C

### A.2 – Salina peptonada a 0,1%

Cloreto de sódio.....	3,4 g
Peptona.....	0,4 g
Água purificada.....	400 mL

Dissolver os ingredientes em água purificada. Distribuir volumes de 100 mL em frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Esterilizar a 121°C por 20 minutos.

pH final:  $7,0 \pm 0,2$  a 25°C