



Avaliação de Matrizes de Carne Bovina na Produção de Itens de Ensaio de Proficiência para Pesquisa de *Salmonella* spp.*

Evaluation of Different Matrices of Meat for Production of Proficiency Testing Items for *Salmonella* spp. Detection

Marcelo Luiz Lima Brandão^{1*}

Carla de Oliveira Rosas¹

Silvia Maria Lopes Bricio²

Juliana de Castro Beltrão da Costa¹

Luzianne da Rosa Vieira³

Valéria de Mello Medeiros¹

Márcia Barbosa Warnken²

Resumo

Objetivo: Avaliar três tipos de matrizes cárneas (autoclavada a 121°C/15 min, cozida por 20 min e enlatada) na produção de itens de ensaio (IE) contendo *Salmonella* spp., a serem utilizados em um Ensaio de Proficiência (EP). **Material e Métodos:** O lote de IE foi preparado utilizando a técnica de liofilização e a trealose como crioprotetor e avaliados quando a sua homogeneidade e estabilidade. **Resultados:** Os lotes produzidos com carne cozida e com carne enlatada não se apresentaram suficientemente homogêneos. Os IE produzidos em matriz carne autoclavada foram considerados suficientemente homogêneos e estáveis à temperatura de $\leq -70^{\circ}\text{C}$ durante o período de quatro meses. No estudo de estabilidade em curta duração, os IE apresentaram-se suficientemente estáveis nas temperaturas de -20, 4 e 25°C durante três dias. **Conclusão:** A carne autoclavada a 121°C/15 min foi considerada uma matriz satisfatória para produção de IE contendo *Salmonella* spp. aplicáveis a um EP.

Palavras-chave: Carne bovina. *Salmonella* spp. Itens de ensaio. Produção. Homogeneidade. Estabilidade.

Abstract

Objective: Evaluate three types of meat matrices (autoclaved at 121°C/15 min, cooked for 20 min and canned) for production of proficiency testing items (TI) containing *Salmonella* spp. to be used in a Proficiency Test (PT). **Materials and Methods:** The batch of TI was prepared using freeze-drying technique and trehalose as a cryo-protector and its homogeneity and stability was evaluated. **Results:** The batches produced with cooked meat and canned meat did not present enough homogeneity. The TI produced with autoclaved meat matrix were considered sufficiently homogeneous and stable at $\leq -70^{\circ}\text{C}$ during four months. In the short-term stability study the TI presented sufficiently stability at -20, 4, and 25°C during 3 days. **Conclusion:** The autoclaved meat at 121°C/15min was considered a satisfactory matrix for the production of TI containing *Salmonella* spp. applicable to a PT.

Keywords: Beef. *Salmonella* spp. Proficiency testing items. Production. Homogeneity. Stability

1 Mestre em Vigilância Sanitária – Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswald Cruz - Técnico em Saúde Pública.

2 Doutora em Vigilância Sanitária – Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswald Cruz - Tecnologista em Saúde Pública.

3 Graduação em Ciências Biológicas – Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fundação Oswald Cruz – Bolsista PIBITI/Fiocruz.

Autor para correspondência: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br, Departamento de Microbiologia – INCQS/Fiocruz, Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: (21)3865-5161. Fax: (21)2290-0915.

Introdução

A carne bovina é produzida e consumida em grande escala e possui grande interesse econômico no Brasil devido ao seu grande volume de exportação. A carne brasileira possui forte controle de inspeção sanitária, sendo realizado nas diferentes esferas do governo (Federal, Estadual e Municipal) (1). A exigência de medidas de controle sanitário pode representar barreiras técnicas a exportação e gerar grandes prejuízos quando não são cumpridas (2,3).

No Brasil, de 2000 até 2011, foram registrados 3.487 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) com identificação do alimento incriminado, sendo que 358 destes (10,3%), foram associados ao consumo de carne bovina *in natura*, processada e miúdos (4). O gado é um reservatório natural das salmonelas e a carne processada é comumente identificada como veículo associado a surtos de DTA (2). São estimados que aproximadamente 94 milhões de casos de diarreia humana e 155.000 óbitos ocorram anualmente no mundo devido a infecções por *Salmonella* (5). Isso torna a salmonelose uma das principais DTA de interesse em Saúde Pública (3). Logo é de suma importância que os laboratórios de ensaio que realizem análises de controle em alimentos estejam capacitados e que produzam resultados confiáveis na pesquisa deste patógenos em matrizes cárneas.

O Ensaio de Proficiência (EP) é uma ferramenta de controle da qualidade externa que avalia o desempenho do participante contra critérios pré-estabelecidos por meio de comparações interlaboratoriais (6). Os provedores de EP na área de microbiologia de alimentos disponibilizam itens de ensaio (IE) destinados a ensaios de detecção e/ou contagem de micro-organismos em alimentos previstos nas legislações vigentes (7). No Brasil a RDC n.º 12 de 2001 (8) é o regulamento técnico que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos. Para o grupo de carne e produtos cárneos, esta resolução estabelece como um dos critérios a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g.

Os IE destinados a EP devem ser suficientemente homogêneos e estáveis para o uso pretendido (9). A problemática na obtenção de um lote de IE com estas características é a instabilidade natural dos micro-organismos em determinadas matrizes (10,11). Dentre os métodos de produção de IE contendo bactérias, a liofilização é um dos mais utilizados, tendo sido eficiente para produção de diferentes lotes de IE contendo diferentes espécies bacterianas em matrizes como leite e queijo (10,11,12,13,14,15,16). Contudo, esse método causa danos às células bacterianas e algumas bactérias podem não sobreviver durante um longo período na matriz (17). Uma forma de tentar contornar esse problema é o uso de crioprotetores. Dentre os diferentes tipos de crioprotetores, os carboidratos são os mais comumente utilizados e tem apresentado resultados satisfatórios na produção de IE contendo bactérias (11).

O objetivo do trabalho foi avaliar três tipos de matrizes cárneas na produção de IE para EP contendo *Salmonella* spp., utilizando a liofilização como técnica de preservação e a trealose como crioprotetor.

Material e Métodos

Cepa Bacteriana

Para a produção dos IE, foi selecionada uma cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis fagotipo PT-4, isolada a partir de sobrecoxa de frango congelada. Esta cepa se encontra depositada na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz com número de depósito P3440.

Avaliação das Matrizes Cárneas para Produção dos Itens de Ensaio

Inicialmente foram produzidos três lotes de IE utilizando três matrizes de carne bovina submetidas a diferentes formas de processamento, com objetivo de avaliar a melhor candidata para produção de um lote de IE para um EP. Foram estudadas as seguintes matrizes: carne autoclavada (SA01), carne cozida (SA02) e carne enlatada (SA03). Cada lote foi composto por 84 unidades. As amostras de carne utilizadas como matrizes foram obtidas no comércio do município do Rio de Janeiro. A matriz de carne enlatada foi utilizada diretamente por ser um alimento comercialmente estéril. Para garantir a eliminação de contaminação intrínseca presente na matriz de carne crua, uma amostra foi esterilizada em autoclave a 121°C /15 min, e outra amostra foi submetida a cozimento simples por 20 min.

Cada matriz foi fracionada e distribuída em frascos de vidro estéreis com capacidade de 10 mL (Schott, BRASIL). Foram pesados dois gramas de cada matriz nos frascos, em condições assépticas. Após a distribuição, rolhas de borracha estéreis próprias para liofilização (West Pharmaceutical, BRASIL) foram posicionadas, de modo que os orifícios laterais das rolhas ficassem expostos. Posteriormente os frascos foram congelados em freezer a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ (Thermo, EUA) por 24 h e submetidos a um ciclo de liofilização por 24 h a temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ e pressão inferior a 100 μHg em aparelho liofilizador K105 (Liotech, BRASIL). Após a liofilização os frascos contendo a matriz liofilizada foram armazenados a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ (Thermo, EUA) até o momento do preparo dos IE.

Produção dos Itens de Ensaio

O desenvolvimento desta metodologia teve como base o estudo descrito por Rosas *et al.* (16), que obtiveram resultados satisfatórios na produção de IE contendo *Salmonella* spp. em matriz de leite, utilizando a técnica de liofilização. Em adição, foi utilizada a trealose como crioprotetor segundo Brandao *et al.* (11).

A cepa de *S. Enteritidis* foi cultivada em caldo Luria Bertani (Difco, EUA) contendo 10% de NaCl (Merck,

ALEMANHA) e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Dois mililitros da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min (Eppendorf, EUA) e o sedimento ressuspensão em solução salina peptonada (SSP) a 0,1% (Merck, ALEMANHA) contendo trealose a 100 mM. A concentração de células foi ajustada em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, INGLATERRA) em comprimento de onda de 520 nm até uma transmitância de 2%. Posteriormente esta suspensão foi diluída em SSP a 0,1% contendo 100 mM de trealose até atingir uma concentração final de aproximadamente 104 células/mL. Após a homogeneização, volumes de 0,5 mL da suspensão foram distribuídos nos frascos contendo a matriz previamente liofilizada. Os frascos foram congelados em freezer $\leq -70^\circ\text{C}$ (Thermo, EUA) por 24 h e submetidos a um novo ciclo de liofilização por 24 h nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao término da liofilização os frascos foram fechados sob vácuo, lacrados com tampa metálica, identificados e estocados em freezer a $\leq -70^\circ\text{C}$ (Thermo, EUA).

Inspeção visual e verificação de vácuo

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

Estudo da homogeneidade

A homogeneidade de cada lote foi realizada a partir da contagem do número de células de 10 frascos sorteados aleatoriamente pelo programa Microsoft Office Excel® 2010. A quantificação de células em cada frasco foi realizada segundo a metodologia descrita por Schulten *et al.* (18) com algumas modificações.

Os frascos foram retirados do freezer a $\leq -70^\circ\text{C}$ e acondicionados a temperatura ambiente durante 30 min. Após este período, os frascos foram abertos e hidratados com 2 mL de uma solução contendo 18 mL de SSP a 0,1% e mantidos em repouso durante 15 min. O conteúdo do frasco foi transferido para um saco plástico estéril *Whirl-Pak*® *Filter Bag* (Nasco, EUA) seguido da adição dos outros 16 mL restantes da SSP a 0,1% atingindo a proporção 1:10. O saco foi homogeneizado em aparelho Stomacher® (Seward Fisher Scientific, CANADÁ) em velocidade “normal” durante 60 s. O homogenato foi diluído novamente 10x (diluição 10^{-2}) no mesmo diluente e alíquotas de 1 mL foram semeadas, em duplicata, em superfície de ágar padrão para contagem (Difco, EUA). As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 h. Posteriormente foram adicionados 10 mL de ágar Bile Vermelho Violeta com Glicose em dupla concentração (Difco, EUA) e reincubadas até um total de 48 h. Foi realizada a contagem das colônias características (vermelhas) presentes nas placas em contador de colônias. Os resultados das contagens foram expressos em \log_{10} do

número de UFC/g e submetidos à análise estatística segundo as orientações do Protocolo Internacional Harmonizado (9) e da norma ISO 13528 (19).

Estudo da estabilidade

A estabilidade em longa duração foi avaliada na temperatura de estoque de $\leq -70^\circ\text{C}$ durante o período de quatro meses. A cada ensaio, seis frascos do lote foram sorteados aleatoriamente e submetidos à contagem, em condições de repetitividade, conforme descrito no estudo da homogeneidade. A média das contagens obtidas durante o estudo da homogeneidade foi considerada como tempo “zero” de armazenamento.

No estudo de estabilidade em curta duração, que simula as temperaturas de transporte que o IE poderá ser exposto durante o envio aos laboratórios participantes do EP, foi utilizada a metodologia do modelo isócrono (20). Esta metodologia se baseia no estoque de amostras em diferentes períodos de tempo, com a realização das análises de todas as amostras em um mesmo momento. Diariamente, até um total de três dias, dois frascos de cada lote produzido estocados a $\leq -70^\circ\text{C}$, selecionados aleatoriamente, foram acondicionados em quatro embalagens próprias para transporte de material biológico (Concepta, BRASIL). Cada uma das caixas foi mantida em uma das seguintes temperaturas: -20, 4, 25, e 35°C . Após o terceiro dia de incubação, os frascos foram analisados ao mesmo tempo, sob as mesmas condições de análise.

A avaliação estatística dos resultados da estabilidade foi realizada por uma análise de tendência e através de regressão linear utilizando o programa Microsoft Office Excel® 2010, segundo os critérios descritos na ISO GUIDE 35 (21). Este teste estatístico avalia a variação da estabilidade dos analitos ao longo do tempo. Caso não ocorra variação da concentração do analito em função do tempo, o material é considerado suficientemente estável.

Resultados

Inspeção visual das amostras liofilizadas

Nenhuma amostra apresentou colapso ou caramelização após o procedimento de liofilização.

Verificação do vácuo

A presença de vácuo nos lotes produzidos variou de 87,2 a 98,8 % (Tabela 1).

Avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio

As médias das contagens dos frascos utilizados para o teste da homogeneidade dos lotes produzidos são apresentadas na Tabela 2.

De acordo com a avaliação estatística, os lotes produzidos no estudo preliminar para escolha da matriz carne (SA01-03) foram considerados suficientemente homogêneos segundo a norma ISO 13528 (19) (Tabela 3). Contudo, apenas o lote SA01 também atendeu os critérios

Tabela 1. Resultado da presença de vácuo nos frascos do lote após o processo de liofilização.

Lote	Fracos que não apresentaram vácuo (%)	Fracos que apresentaram vácuo (%)	Total
SA01	2 (2,4)	82 (97,6)	84
SA02	1 (1,2)	83 (98,8)	84
SA03	6 (7,2)	78 (92,8)	84
SA04	11 (12,8)	75 (87,2)	86
SA05	6 (7)	80 (93)	86

Tabela 2. Resultados do teste de homogeneidade dos lotes SA01-05. Os valores representam a média da duplicata obtidos em UFC/g e convertidos em Log10.

Frasco	Lote (Log ₁₀ UFC/g)				
	SA01	SA02	SA03	SA04	SA05
1	2,151	3,075	2,722	3,821	3,255
2	2,628	2,658	2,940	3,798	3,113
3	2,000	2,518	1,699	3,652	3,339
4	2,477	2,748	2,320	3,673	3,389
5	2,151	2,351	2,891	3,832	3,509
6	2,389	2,776	2,831	3,970	3,505
7	2,389	2,050	2,331	3,788	3,461
8	2,739	2,220	2,332	3,698	3,060
9	2,452	2,458	2,568	3,792	3,366
10	2,651	2,720	2,369	4,000	3,537

Tabela 3. Avaliação da homogeneidade dos lotes SA01-05 segundo a norma ISO 13528.

Lote	SA01	SA02	SA03	SA04	SA05
Desvio-padrão alvo (σp)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Desvio-padrão dentro das amostras	0,341	0,425	0,529	0,163	0,234
Resultado	SHa	SH	SH	SH	SH

^a- Suficientemente homogêneo.

Tabela 4. Avaliação da homogeneidade dos lotes SA01-05 segundo o Protocolo Internacional Harmonizado.

Lote	SA01	SA02	SA03	SA04	SA05
Desvio-padrão alvo (σp)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Desvio-padrão entre as amostras	0,12	0,18	0,28	0,026	0,055
Desvio-padrão dentro das amostras	0,058	0,015	0,0068	0,0027	0,012
Variância entre as amostras	0,029	0,083	0,14	0,012	0,021
Valor crítico 'c'	0,069	0,026	0,017	0,013	0,023
Resultado	SHa	NSHb	NSH	SH	SH

^a- Suficientemente homogêneo; ^b- Não suficientemente homogêneo.

Tabela 5. Análise de regressão obtida no estudo da estabilidade em longa duração (≤-70°C) dos lotes SA04 e SA05.

Lote	SA04	SA05
Coefficiente Angular	-0,00115	0,00075
Limite Inferior (95%)	-0,00428	-0,00517
Limite Superior (95%)	0,00195	0,00667
Resultado	Suficientemente estável	Suficientemente estável

Tabela 6. Análise de regressão obtida no estudo da estabilidade em curta duração dos lotes SA04 e SA05.

Lote	SA04			SA05		
Temperatura	-20°C	4°C	25°C	-20°C	4°C	25°C
Coefficiente Angular	-0,058	-0,078	-0,064	-0,271	-0,228	-0,305
Limite Inferior (95%)	-0,343	-0,314	-0,279	-0,790	-0,747	-2,437
Limite Superior (95%)	0,226	0,157	0,150	0,247	0,290	1,828
Resultado	SE ^a	SE	SE	SE	SE	SE

^a- Suficientemente estável.

da verificação da precisão da homogeneidade descritos no Protocolo Internacional Harmonizado (9), cuja variância entre as amostras deve ser menor que o valor crítico 'c' (Tabela 4). Com base nestes resultados, a matriz carne crua autoclavada foi selecionada e dois novos lotes desta matriz (SA04 e SA05) foram produzidos nas mesmas condições descritas anteriormente. Esses novos lotes apresentaram-se suficientemente homogêneos de acordo com as duas avaliações estatísticas (Tabelas 3 e 4).

Avaliação da estabilidade dos itens de ensaio

Baseado nos critérios da ISO GUIDE 35 (21), os lotes SA04 e SA05 não apresentaram tendência e foram considerados suficientemente estáveis durante o período avaliado, uma vez que o intervalo de confiança a 95% abrange o valor “zero” (Tabela 5).

Realizando uma análise dos resultados do estudo de estabilidade em curta duração foi observada tendência ao decréscimo da concentração celular dos IE na temperatura de 35°C, indicando que os lotes SA04 e SA05 não são suficientemente estáveis nesta condição. Desta forma, não foi aplicado à análise de regressão linear nas contagens obtidas nesta temperatura. Na análise de regressão linear realizada nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C durante os três dias os lotes SA04 e SA05 foram considerados suficientemente estáveis (Tabela 6).

Discussão

Neste estudo, três tipos de carne bovina submetidas a diferentes tratamentos foram avaliadas como matriz na produção de IE destinado ao ensaio de detecção de

Salmonella spp. A presença de vácuo foi detectada em cerca de 90% dos frascos dos lotes produzidos, indicando que o processo de liofilização foi eficiente para o uso pretendido. Resultados similares foram obtidos por outros autores que produziram lotes de IE em frascos de mesma capacidade e obtiveram presença de vácuo em 83,3 % (13), 98,2 % (15) e 100,0 % (10).

Apenas os lotes produzidos com carne crua autoclavada apresentaram-se suficientemente homogêneos segundo o Protocolo Internacional Harmonizado (9), com desvio-padrão alvo (σ) atribuído de 0,25 \log_{10} da concentração de células. O parâmetro σ descreve a incerteza-padrão que é mais apropriada para a área de aplicação dos resultados da análise, ou em outras palavras, “adequada ao propósito”. O σ atribuído neste estudo foi o mesmo adotado pelo INCQS/Fiocruz em diferentes rodadas de EP (7). Os lotes SA04 e SA05 produzidos com carne crua autoclavada também foram considerados suficientemente homogêneos, demonstrando que o processo pode ser reproduzido.

A técnica de liofilização já foi utilizada por outros autores para produção de IE suficientemente homogêneos destinados a ensaios microbiológicos em alimentos. Rosas *et al.* (16) produziram IE contendo *S. Enteritidis* em matriz leite e obtiveram lotes suficientemente homogêneos. Contudo, nas fontes de dados consultadas, não existem dados referente à produção de IE contendo *Salmonella* spp. em matrizes cárneas ou outras matrizes sólidas. Brandao *et al.* (10, 13, 15) tiveram sucesso na produção de lotes de IE suficientemente homogêneos contendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Listeria monocytogenes* em matriz queijo.

Os lotes produzidos neste estudo foram considerados estáveis na temperatura de referência ($\leq -70^\circ\text{C}$) durante o período estudado (Tabela 5). Outros autores também obtiveram resultados satisfatórios na produção de IE estáveis à temperatura de $\leq -70^\circ\text{C}$ em matrizes leite e queijo durante todo o período de estocagem (10,12,13,14,15). Outra técnica utilizada na produção de IE é o *spray-dryer*, Schuten *et al.* (18) produziram um IE por esta técnica, contendo *S. Typhimurium* em leite em pó estável por dois anos a $\leq -70^\circ\text{C}$. Contudo, esta técnica não seria viável para a matriz carne bovina.

Os bons resultados obtidos neste estudo com relação a estabilidade podem estar associados ao uso da trealose como crioprotetor, proporcionando assim maior proteção aos micro-organismos na matriz. O acúmulo intracelular da trealose estabiliza a membrana citoplasmática durante a desidratação, promovendo uma maior resistência da célula a este processo (17). Em um estudo comparativo utilizando diferentes crioprotetores na produção IE contendo *E. coli* em matriz leite, foi verificado que a sacarose e a trealose apresentaram melhores resultados nos estudos da estabilidade (11).

No estudo de estabilidade em curta duração os IE foram considerados suficientemente estáveis em todas as temperaturas exceto a 35°C , uma vez que apresentou uma clara tendência no sentido decrescente do número de células ao longo dos dias, indicando que se os IE fossem

mantidos nestas condições por mais tempo, a concentração de células poderia ser comprometida. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Rosas *et al.* (16), que ao estudarem a estabilidade de IE contendo *Salmonella* spp. em matriz leite durante sete dias, obtiveram estabilidade a 4°C , mas observaram a não estabilidade nas temperaturas de 25 e 37°C . Esse fenômeno também foi observado em outros lotes de IE estocados a 35°C contendo outras bactérias e matrizes, como *S. aureus* em matriz queijo (13), *E. coli* em matriz leite (11). Os resultados do estudo da estabilidade em curta duração indicam a possibilidade dos IE produzidos serem transportados aos laboratórios participantes de um EP, localizados em diferentes regiões do país, a temperaturas $\leq 25^\circ\text{C}$ em um período de até três dias, uma vez que os resultados demonstraram a manutenção da concentração de células dos IE nestas condições.

Conclusão

Conclui-se que a autoclavação a $121^\circ\text{C}/15$ min foi considerada como o melhor processamento a ser aplicado a carne bovina crua antes da sua utilização como matriz para produção dos IE. A técnica de liofilização e o uso da trealose como crioprotetor foram adequados para a produção dos IE contendo *Salmonella* em matriz carne bovina. A temperatura de $\leq -70^\circ\text{C}$ foi adequada para manutenção da concentração celular dos IE produzidos durante todo o período estudado. A partir da técnica desenvolvida neste estudo, um novo lote de IE poderá ser produzido e disponibilizado em um EP em nível nacional, de forma a contribuir para a garantia da qualidade analítica dos laboratórios brasileiros na área de microbiologia de alimentos.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz pela sorotipagem e fagotipagem da cepa de *Salmonella* Enteritidis. Ao CNPq pela concessão de bolsa PIBITI a Luzianne Gomes.

Referências

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária - Setembro de 2014 [Internet]. Brasília: Santos AHGS; 2014. 48 p. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201402_publ_completa.pdf.
2. Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of *Salmonellae* in commercial ground beef in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(7): 1892-900.
3. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Filho JLL. *Salmonella* spp., importante

agente patogênico veiculado em alimentos. Ciênc Saúde Coletiva. 2008; 12(5): 1669-74.

4. Brasil. Ministério da Saúde. Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar – UHA, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011. [Internet]. Brasília: SVS; 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf.

5. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010; 60(6): 882-9.

6. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISO/IEC 17043: Avaliação de conformidade – Requisitos gerais para ensaios de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT; 2011. 46 p.

7. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Produtos e serviços. Ensaio de Proficiência (EP/INCQS). [Internet]. Rio de Janeiro: INCQS. Disponível em: http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=72

8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, n.7-E, p. 45-53.

9. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. Pure Appl Chem. 2006; 78(1): 145-96.

10. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, Costa JCB, Pinheiro RR, *et al.* Preparation of reference material for proficiency test for enumeration of coliforms in cheese matrix. Detection. 2013; 1: 7-12.

11. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB, *et al.* Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. Rev Inst Adolfo Lutz. 2013; 72(2): 1-10.

12. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. Analytica (São Paulo). 2013 fev/mar; 11(63): 60-71.

13. Brandao MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS, *et al.* Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. Braz J Food Technol. 2013; 16(1): 73-9.

14. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, De La Cruz MHC, *et al.* Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leite. Vig Sanit Debate. 2014; 2(1): 39-45.

15. Brandao MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS, *et al.* Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo *Listeria monocytogenes* em matriz queijo. Cienc Rural. 2013; 43(10): 1905-10.

16. Rosas CO, Brandao MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De La Cruz MHC, *et al.* Desenvolvimento de Material de Referência em Microbiologia de Alimentos. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010; 69(1): 15-22.

17. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. J Microbiol Meth. 2006; 66(2): 183-93.

18. Schulten SM, In't Veld PH, Ghameshlou Z, Schimmel H, Linsinger T. The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella* typhimurium and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk powder: CRM 507R. Belgium: European Commission; 2001. 74 p.

19. International Organization for Standardization. ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Switzerland: ISO; 2005. 66 p.

20. Lambert A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. Fresenius J Anal Chem. 1998; 360(3-4): 359-61.

21. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT ISO GUIA 35. Materiais de Referência - Princípios Gerais e Estatísticos para Certificação. Rio de Janeiro: ABNT; 2012.