

Preparo de Itens de Ensaio de Proficiência em Matriz Queijo para a Pesquisa de *Salmonella* spp.

Preparation of Proficiency Test Items for *Salmonella* spp. Detection in Cheese Matrix

Juliana de Castro Beltrão da Costa^{1,*}

Carla de Oliveira Rosas¹

Silvia Maria Lopes Bricio¹

Marcelo Luiz Lima Brandão¹

Valéria de Mello Medeiros¹

Rodrigo Rollin Pinheiro¹

Mariana Ambrósio Andrade Machado¹

Marcus Henrique Campino de la Cruz¹

Armi Wanderley da Nóbrega^{II}

Sonia Couri^{III}

RESUMO

A participação de laboratórios analíticos em ensaio de proficiência permite a verificação da confiabilidade dos resultados gerados nas análises de controle da qualidade. O objetivo deste estudo foi produzir um lote de itens de ensaio (IE) a ser utilizado em ensaio de proficiência (EP) para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz queijo. Queijo Minas Frescal (QMF) Ultrafiltrado foi utilizado como matriz e fortificado com uma cepa de *Salmonella* Enteritidis. A trealose foi utilizada como crioprotetor e a liofilização como técnica de preservação. O lote foi avaliado quanto a verificação do vácuo, teste da homogeneidade, estudo da estabilidade em longo prazo nas temperaturas de -70°C (referência) e -20°C (armazenamento) e em curto prazo nas temperaturas de 4, 25 e 35°C (transporte). O lote apresentou presença de vácuo em 95,6% dos frascos e foi considerado suficientemente homogêneo. Os IE apresentaram estabilidade a -70°C superior a 360 dias e a -20°C superior a 160 dias. Os IE demonstraram ser estáveis por até seis dias nas temperaturas de 4 e 25°C, mas não a 35°C. Conclui-se que a metodologia utilizada foi satisfatória para produção de IE para o ensaio de pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz queijo.

PALAVRAS-CHAVE: Itens de ensaio; Ensaio de proficiência; Queijo; *Salmonella* spp.

ABSTRACT

The participation of analytical laboratories in proficiency testing allows the verification of the reliability of results in analysis of quality control. The aim of this study was to produce a batch of test items (TI) to be used in a proficiency assay for *Salmonella* spp. research in a cheese matrix. Ultrafiltered Minas cheese was used as the matrix and spiked with a strain of *Salmonella* Enteritidis. Trehalose was used as cryoprotectant, and freeze-drying was used as the preservation technique. The batch was evaluated for vacuum verification, homogeneity study, and long-term stability testing at temperatures of -70°C (reference temperature) and -20°C (storage temperature). The batch was also evaluated for short-term stability at temperatures of 4°C, 25°C, and 35°C (transport temperatures). The results showed vacuum in 95.6% of the bottles, and the batch was considered sufficiently homogeneous. TI remained stable at -70°C for more than 360 days and at -20°C for more than 160 days. TI was shown to be stable for up to 6 days at 4°C and 25°C but not at 35°C. It is concluded that the methodology used was satisfactory for this TI production for *Salmonella* spp. research in a cheese matrix.

KEYWORDS: Test material; Proficiency assay; Cheese; *Salmonella* spp.

^I Laboratório de Alimentos e Saneantes, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Coordenação de Programas de Ensaio de Proficiência, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: julibeltcosta@yahoo.com.br



INTRODUÇÃO

Salmonella é uma bactéria de ampla ocorrência em animais e no ambiente e possui o potencial de atingir toda a cadeia de produção de alimentos a partir dos produtos primários. Vários alimentos já foram implicados em surtos de salmonelose, como pescados, produtos de confeitaria recheados com cremes, gelatina desidratada, cacau, chocolate, coco, molhos, coberturas para saladas não industrializadas e pratos preparados com ovos crus¹. Existem atualmente 2.610 sorovares de *Salmonella* spp., sendo que 70 novos sorovares foram reconhecidos entre 2003 e 2007².

A maioria dos sorovares tem um espectro de hospedeiros amplo e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicação e sem necessidade de tratamento. Em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, ao contrário, essas infecções podem ser severas. Os sorovares mais importantes na transmissão de doenças transmitidas por *Salmonella* de animais para humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium².

No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), no período de 1999 a abril de 2013, foram notificados ao Ministério da Saúde 8.871 surtos e dentre eles, 6,9% envolveram leite e derivados. Do total de surtos, 44,27% tiveram agente etiológico definido pelo critério laboratorial ou clínico-epidemiológico. Dentre estes, a bactéria do gênero *Salmonella* foi relacionada a 39,39% dos surtos³.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o “regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos” no Brasil⁴. Essa legislação descreve como critério a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g para a maioria dos alimentos submetidos a controle microbiológico, e dentre eles está o Queijo Minas Frescal (QMF).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil, onde um dos tipos de maior consumo é o QMF^{5,6}. É um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos^{6,7}. Por ser um alimento de pronto consumo e indicado para idosos, gestantes e convalescentes, a sua inocuidade é de suma importância para que estes não venham a causar riscos à saúde do consumidor^{8,9}. A principal forma de se avaliar a inocuidade desses produtos é através do controle da qualidade microbiológica.

Atualmente, a implementação de programas de garantia da qualidade nas práticas laboratoriais tem sido de grande importância. Entretanto, o emprego de métodos de análise oficiais e a utilização de controles internos, por si só não garantem resultados fidedignos¹⁰. A NBR ISO/IEC 17025¹¹ é a principal norma utilizada como sistema da qualidade em laboratórios de ensaios analíticos^{12,13}. Dentre os requisitos apontados na Norma, para o controle de qualidade dos resultados das análises estão: o uso de métodos validados, a utilização de materiais de referência

para o controle laboratorial interno e a participação periódica do laboratório em programas de ensaio de proficiência (EP) e/ou comparações interlaboratoriais¹³.

Ensaio de proficiência tem o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos resultados gerados nas análises laboratoriais de controle de qualidade¹³.

O número de provedores de EP na área de alimentos é reduzido. Além disso, os custos cobrados para a participação nestes ensaios, principalmente de provedores internacionais são normalmente muito elevados, o que inviabiliza em muitos casos a participação dos laboratórios brasileiros. Assim, o desenvolvimento de itens de ensaio nacionais destinados a ensaio de proficiência no Brasil, na área de microbiologia de alimentos irá facilitar a participação de laboratórios brasileiros nesses ensaios¹⁴.

Os itens de ensaio (IE) destinados a análises microbiológicas na área de alimentos disponibilizados por provedores de EP, em geral atendem aos escopos de ensaios qualitativos (presença/ausência) e quantitativos^{14,15,16,17,18,19,20}. Os IE qualitativos são utilizados na verificação da presença da bactéria alvo no alimento, como é o caso de determinados patógenos como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*^{9,21}.

Quando preparados para serem utilizados em EP, os lotes de IE devem ser suficientemente homogêneos e estáveis, assegurando a distribuição de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão²².

Durante o preparo de IE microbiológicos, cuidados devem ser aplicados na homogeneização da matriz com o contaminante, de forma a se obter uma dispersão precisa de células no material²¹. Da mesma forma, aspectos referentes à estabilidade das células devem ser considerados e controlados nos procedimentos de congelamento, liofilização, estoque e transporte²³.

Alguns autores citam a utilização de substâncias protetoras, tais como trealose, sacarose, manitol e sorbitol, a fim de aumentar a tolerância das células bacterianas ao congelamento e dessecação^{23,24}. Segundo Morgan e colaboradores²⁵, tanto a trealose como a sacarose preservam a estrutura e função das proteínas da membrana, prevenindo a desnaturação dessas moléculas durante o congelamento e a dessecação.

O objetivo deste trabalho foi produzir IE em matriz queijo para pesquisa de *Salmonella* spp., utilizando a trealose como crioprotetor e a liofilização como técnica de preservação.

METODOLOGIA

Desenvolvimento das metodologias de produção dos IE

O desenvolvimento da metodologia para a produção do lote de IE teve como base as informações de In't Veld et al.²⁶, Morgan et al.²⁵ e de Rosas et al.¹³, que utilizaram a técnica de liofilização e



obtiveram resultados satisfatórios na produção de IE contendo *Salmonella* spp. em matriz leite em pó.

Seleção e preparo da matriz para produção dos IE

O micro-organismo escolhido para a produção do lote de IE foi *Salmonella* Enteritidis fagotipo PT-4 isolado de uma amostra de frango. Essa cepa recebeu a identificação P3440 da Coleção de Pesquisa de Micro-organismos em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz.

A cepa de *Salmonella* spp. foi cultivada em caldo infusão cérebro-coração (Merck, ALEMANHA) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h e em seguida em Caldo LB com NaCl (Difco, EUA) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 28 h. Posteriormente foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina peptonada a 0,1% (SSP) (Merck, ALEMANHA) com 100 mM de trealose (Merck, ALEMANHA), ajustada em fotocolorímetro a uma concentração equivalente a 2×10^8 células/mL. Diluições foram realizadas em SSP a 0,1% para alcançar a concentração aproximada de 4×10^5 células/mL. Dois mililitros da suspensão foram adicionados a 198 mL de SSP 0.1% contendo 100 mM trealose. A solução foi homogeneizada em uma placa agitadora sem aquecimento (Corning, EUA) para a obtenção da suspensão final a uma concentração aproximada de 4×10^3 células/mL. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow, INGLATERRA), volumes de 0,5 mL da suspensão foram distribuídos em frascos contendo dois gramas de QMF pré-liofilizado por 24 h (Liotop; BRASIL). Os frascos foram submetidos ao congelamento a -70°C em *ultrafreezer* (Thermo; USA) e submetidos a um novo ciclo de liofilização por 24 h (Liotop; BRASIL).

O QMF utilizado como matriz foi previamente analisado quanto a presença de *Salmonella* spp. e o número total de viáveis aeróbios/g conforme descrito por Brandão et al⁹.

Inspeção Visual e Verificação de Vácuo

Após a retirada dos frascos fechados do liofilizador, foi feita uma inspeção visual com o objetivo de avaliar o aspecto dos líofilos, de forma a reprovar amostras que apresentassem umidade ou coloração alterada. As amostras que apresentaram perfeitas condições foram testadas quanto à presença de vácuo, utilizando um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil, 2-12-8, BRASIL). Os frascos que apresentaram vácuo foram lacrados com tampas de metal, etiquetados e estocados à temperatura de referência de -70°C . A detecção de vácuo nos frascos liofilizados é um indicador da qualidade da liofilização e proporciona uma maior estabilidade aos IE produzidos.

Teste da Homogeneidade

Para a avaliação da homogeneidade foi realizada a quantificação de 24 unidades do lote de IE preparado. Os frascos foram selecionados aleatoriamente, usando a ferramenta “amostragem” do programa Microsoft Office Excel[®] 2010. Os frascos foram retirados do *ultrafreezer* a -70°C e mantidos a temperatura ambiente durante 30 min antes da análise. A matriz foi reconstituída com 2 mL de SSP a 0,1%. Após 15 min, a matriz foi transferida para um saco plástico estéril *Whirl-Pak[®] Filter Bag* (Nasco, EUA),

homogeneizada com um volume adicional de 16 mL de SSP a 0,1% em aparelho *Stomacher* (Seward Fisher Scientific, CANADÁ), em nível de velocidade “normal” durante 60 s, sendo este homogenato considerado como diluição 10^{-1} . A partir da diluição 10^{-1} foram preparadas diluições decimais seriadas. A quantificação foi realizada segundo Kornachi e Johnson²⁷. A partir de cada diluição, foram adicionadas alíquotas de 1 mL em duas placas de Petri estéreis seguido da adição de 10 mL de ágar vermelho neutro cristal violeta bile glicose (VRBG) (Difco, EUA). As placas foram homogeneizadas e após a solidificação foi adicionada uma segunda camada do meio. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Foi realizada a contagem das colônias em contador de colônias (Phoenix Luferto, BRASIL), levando em conta o limite de precisão da técnica de 15 a 150 colônias. A avaliação estatística da homogeneidade foi realizada de acordo com o Protocolo Internacional Harmonizado²².

Estudo da Estabilidade

Foram realizados estudos de estabilidade em curta duração (transporte) e em longa duração (armazenamento e referência). Para os estudos de longa duração foi feito o controle a -70°C (temperatura de referência) após 14, 29, 50, 56, 66, 94, 112, 140, 168, 282 e 362 dias; e a -20°C (temperatura de armazenamento) após 7, 14, 21, 29, 35, 50, 56, 66, 94, 113, 140 e 168 dias. Para cada uma das temperaturas foi realizada a análise de controle do dia zero (material liofilizado e estocado a -70°C). Em cada dia de estudo descrito, dois frascos do lote, selecionados aleatoriamente, foram analisados.

Para a condução do teste de estabilidade em curto prazo, que simula as temperaturas de transporte que os IE poderão ser expostos durante o envio aos laboratórios participantes do EP, foi utilizado o modelo isócrono²⁸. O emprego deste modelo teve como objetivo submeter os IE a avaliações sob condições de repetitividade analítica.

Para avaliar a exposição dos IE nas diferentes temperaturas estudadas, em intervalos distintos de exposição, foram utilizadas três caixas para transporte de material biológico (Concepta, Brasil). Cada uma delas foi incubada em uma das temperaturas de 4°C , 25°C e 35°C durante seis dias. O procedimento de incubação foi iniciado com dois frascos incubados no primeiro dia em cada uma das três caixas, sendo estes mantidos durante seis dias. Mais dois frascos foram acrescentados a cada caixa no terceiro, quarto e no quinto dia, contados do início da incubação. No sexto dia de incubação os IE foram submetidos à análise. A avaliação de controle do dia zero (material mantido à temperatura de referência) foi também realizada.

A metodologia utilizada para enumeração dos micro-organismos nos estudos da estabilidade em longa e curta duração foi a mesma descrita no teste da homogeneidade.

Para a avaliação estatística da estabilidade do lote, foram seguidas as orientações da ABNT ISO GUIA 35²⁹, que determina a análise de resíduos da regressão linear em conjunto com a análise de variância (ANOVA). Esta avaliação permite verificar



se a regressão linear dos valores de concentração dos analitos apresenta tendência ao longo do tempo. Se a inclinação da reta não for significativa, ou seja, se a concentração bacteriana não variar em função do tempo, o material é considerado estável²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção e Preparo da Matriz

A amostra de QMF Ultrafiltrado selecionada como matriz para a produção do lote de IE apresentou ausência de *Salmonella* spp. em 25 g e número total de aeróbios viáveis de $1,2 \times 10^3$ UFC/g. Alguns autores reconhecem que a presença de microbiota natural da amostra é importante para demonstrar a real capacidade do laboratório em enumerar e/ou pesquisar o(s) micro-organismo(s) alvo(s)^{9,30}. Desta forma, a amostra foi considerada adequada para ser utilizada como matriz na produção do lote de IE proposto, por não apresentar o micro-organismo alvo (*Salmonella* spp.) e por apresentar uma microbiota natural, simulando uma amostra próxima a realidade.

Verificação do Vácuo

A porcentagem de frascos que apresentaram vácuo no lote produzido foi de 96,5%. Outros autores que utilizaram a liofilização como técnica de preservação obtiveram um percentual de vácuo variando de 99,2 a 100% em IE na matriz leite¹³; de 94,2% em matriz carne³¹; e variando de 98,2 a 100% em matriz QMF^{9,32,33}.

O percentual de IE que apresentaram vácuo neste estudo foi considerado satisfatório para o uso pretendido, uma vez que seriam suficientes para realização dos ensaios de homogeneidade, de estabilidade e para realização do EP com um número máximo de 60 laboratórios.

Aparência das Amostras Liofilizadas

A inspeção do aspecto visual após o procedimento de liofilização demonstrou que os IE apresentavam coloração branca com ausência de brilho. Nenhum líofilo do lote apresentou colapso ou mudança de coloração. Desta forma, verificou-se que a liofilização não causou alterações não esperadas neste tipo de matriz, como caramelização ou algum outro tipo de escurecimento.

Avaliação da Homogeneidade

No teste da homogeneidade para cada um dos 24 IE foram realizadas contagens em duplicata (A e B) e os resultados estão descritos na Tabela 1.

A homogeneidade foi avaliada segundo o Protocolo Internacional Harmonizado²² atribuindo-se o valor do desvio-padrão alvo (σ_p) para a concentração celular, conforme adotado por outros provedores de EP^{16,17,18,19,34}, de $0,25 \log_{10}$. A partir dos resultados obtidos, foi comparado o valor da variância entre as amostras (S^2_{am}) com o valor crítico da homogeneidade (c), estes indicaram $S^2_{am} < c$. Desta forma, o lote foi considerado homogêneo (Tabela 2).

Tabela 1. Resultados das contagens do teste da homogeneidade do lote produzido.

Frasco	Contagem (UFC/g)		Log ₁₀ ^b	
	A	B	A	B
1	740	560	2,87	2,75
2	865	905	2,94	2,96
3	670	625	2,83	2,80
4	805	740	2,91	2,87
5	620	530	2,79	2,72
6	720	605	2,86	2,78
7	720	730	2,86	2,86
8	765	560	2,88	2,75
9	640	645	2,81	2,81
10	405	480	2,61	2,68
11	750	690	2,88	2,84
12	550	535	2,74	2,73
13	610	740	2,79	2,87
14	740	750	2,87	2,88
15	690	660	2,84	2,82
16	770	710	2,89	2,85
17	730	500	2,86	2,70
18	725	815	2,86	2,91
19	725	765	2,86	2,88
20	460	540	2,66	2,73
21	605	745	2,78	2,87
22	680	590	2,83	2,77
23	505	515	2,70	2,71
24	610	770	2,79	2,89

^a Unidades Formadoras de Colônia; ^b Valor referente ao log₁₀ das contagens.

Tabela 2. Resultados das análises estatísticas do teste da homogeneidade do lote produzido.

Análises Estatísticas	Resultado
Variância entre as amostras (S^2_{am})	0,00343
Valor crítico 'c'	0,00983
Resultado	Suficientemente homogêneo

Outros estudos que utilizaram a matriz QMF Ultrafiltrado também demonstraram resultados homogêneos utilizando o mesmo valor de σ_p ^{9,32,33}. Utilizando o leite como matriz, Rosas et al.¹³ produziram dois lotes de IE para pesquisa de *Salmonella* spp., que foram considerados homogêneos de acordo com o Protocolo Internacional Harmonizado²². Schulten et al.³⁵ também empregaram o leite como matriz na produção de um lote de IE contendo *Salmonella* Typhimurium em cápsulas de leite em pó. O IE foi considerado homogêneo, no entanto, esse estudo utilizou a técnica de *spray-dryer* para a produção do lote e a homogeneidade foi avaliada pela distribuição de "Poisson". Vieira et al.³¹ produziram nove lotes de IE contendo *Salmonella* spp. utilizando diversos tipos de tratamento para a carne bovina utilizada como matriz. Somente o lote produzido em carne crua autoclavada apresentou-se homogêneo.



Avaliação da Estabilidade

Foram avaliadas as flutuações temporais na concentração de *Salmonella* spp. nas temperaturas de referência (-70°C) (Tabela 3 e Figura 1) e na temperatura de armazenamento (-20°C) (Tabela 3 e Figura 2). A influência da temperatura nas condições de transporte foi estudada por seis dias (Tabela 4 e Figura 3).

Ao realizar a análise crítica do gráfico nas respectivas linhas de tendência, foi possível observar que a linha correspondente aos dados da estabilidade de transporte a 35°C demonstrou queda significativa (Figura 3). Os resultados obtidos no tratamento estatístico nos estudos de estabilidade em longo e curto prazo evidenciaram que o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular, de acordo com a abordagem da ISO Guia 35²⁹, abrangeu o valor zero (Tabela 5). Desta forma, pôde-se obter a indicação que os IE se mantêm suficientemente estáveis nas condições de tempo e temperatura de armazenamento e transporte estudadas, exceto a 35°C.

Baseado nestes resultados, o provedor poderia enviar o IE para um laboratório solicitante a temperatura limite de 25°C em até seis dias, o que baratearia o custo do transporte em comparação com o transporte sob refrigeração.

Os bons resultados referentes à estabilidade, obtidos no presente estudo, podem ser decorrentes do uso da trealose como crioprotetor. No estudo realizado por Rosas et al¹³, ao avaliarem a estabilidade de um lote de IE contendo *Salmonella* em matriz leite, verificaram que os mesmos se mantiveram estáveis a -20°C durante três meses. No entanto, o mesmo não foi observado quando o estoque foi prolongado pelo período de um ano. Com relação à estabilidade de transporte, os autores verificaram estabilidade somente a 4°C e relataram perda expressiva na

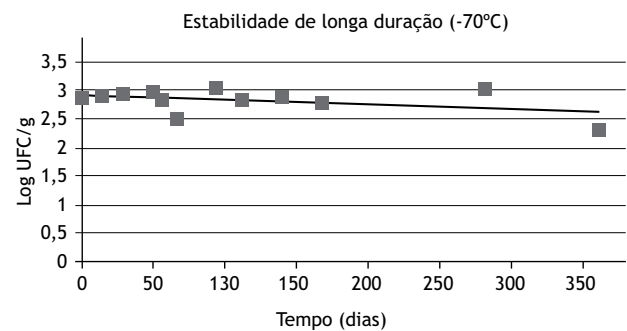
Tabela 3. Resultados do estudo da estabilidade em longo prazo na temperatura de referência (-70°C) e de armazenamento (-20°C).

Dias	Médias (Log ₁₀ ^a UFC ^b /g)	
	Referência (-70°C)	Armazenamento (-20°C)
0	2,876	2,876
7	NR ^c	2,749
14	2,911	2,883
21	NR	2,798
29	2,949	2,918
35	NR	2,130
50	2,960	2,870
56	2,826	2,757
66	2,528	2,638
94	3,050	2,814
112	2,828	NR
113	NR	2,852
140	2,889	2,814
168	2,786	2,844
282	3,040	NR
362	2,318	NR

^a Valor referente em log₁₀ da média das contagens; ^b Unidades Formadoras de Colônia; ^c Não realizado.

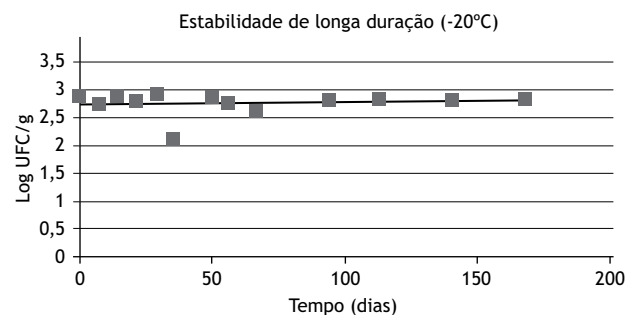
concentração bacteriana já no segundo dia de estoque a 35°C, com subsequentes reduções ao longo dos dias.

Em relação a outros estudos nos quais foram produzidos IE em QMF como matriz, Brandão et al⁹ desenvolveram IE destinados ao ensaio de pesquisa de *L. monocytogenes* pela técnica de liofilização e obtiveram estabilidade nas temperaturas de -70°C e -20°C durante o período de estudo de 300 e 48 dias, respectivamente. Nas temperaturas de transporte, os autores verificaram estabilidade a 4°C, 25°C, 30°C e 35°C nos quatro dias avaliados. Em outro estudo, realizado por Brandão et al³² foi produzido



y= concentração de células (Log₁₀ UFC/g), x= tempo decorrido (dias), ___linha de tendência (Regressão linear) do lote produzido.

Figura 1. Gráfico da variação da concentração de células dos IE estocados à temperatura de -70°C.



y= concentração de células (Log₁₀ UFC/g), x= tempo decorrido (dias), ___linha de tendência (Regressão linear) do lote produzido.

Figura 2. Gráfico da variação da concentração de células dos IE estocados à temperatura de -20°C.

Tabela 4. Resultados das médias das contagens, em Log₁₀, do estudo de estabilidade nas temperaturas de transporte (4°C, 25°C e 35°C).

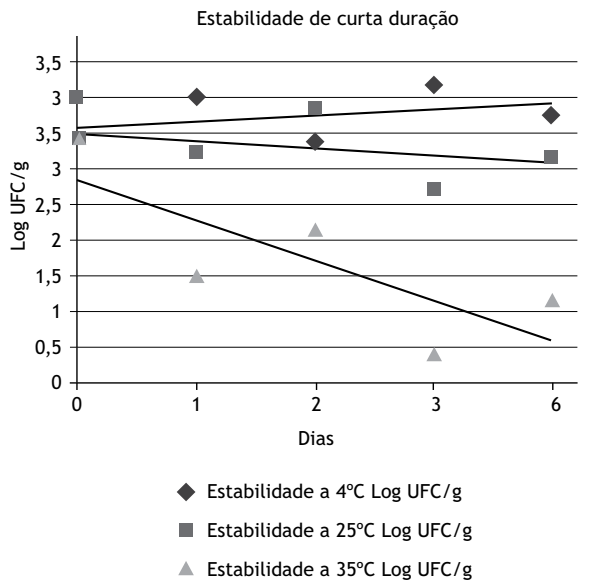
Dias	Resultados		
	Médias (Log ₁₀ ^a UFC ^b /g)		
	4°C	25°C	35°C
0	2,841	2,841	2,841
1	2,901	2,824	2,650
2	2,838	2,885	2,715
3	2,918	2,773	2,539
6	2,876	2,818	2,617

^a Valor referente em log₁₀ da média das contagens; ^b Unidades Formadoras de Colônia.

Tabela 5. Resultados da análise de regressão linear para os diferentes estudos de estabilidade do lote produzido, em $\text{Log}_{10}\text{UFC/g.dias}^{-1}$.

Temperaturas	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
-70°C	-0,00085	0,00054	-0,00206	0,00035	Estável
-20°C	0,00046	0,00115	-0,00207	0,002995	Estável
4°C	0,00432	0,00855	-0,02288	0,03152	Estável
25°C	-0,00545	0,00997	-0,03623	0,02532	Estável
35°C	NR	NR	NR	NR	Não estável

NR: Não realizado



y= concentração de células (Log₁₀ UFC/g), x= tempo decorrido (dias),
— linha de tendência (Regressão linear) do lote produzido.

Figura 3. Gráfico da variação da concentração de células dos IE estocados à temperatura de 4, 25 e 35°C.

um lote de IE destinado ao ensaio de enumeração de estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. A análise estatística demonstrou estabilidade dos IE na temperatura de -70°C durante os dez meses de avaliação, a -20°C por 48 dias e nas temperaturas de transporte de 4°C, 25°C, 30°C e 35°C durante quatro dias. Contudo, na temperatura de 35°C, foi observada tendência de decréscimo na concentração celular indicando e, caso este IE fosse mantido nesta temperatura por mais de quatro dias, a concentração celular poderia ser comprometida. No

estudo realizado por Brandão et al³³, no qual foi desenvolvido IE quantitativo de coliformes em matriz QMF, o lote foi considerado estável por 348 dias a -70°C e durante 161 dias a -20°C já no estudo de transporte foi estável apenas a 4°C por seis dias. Ao comparar os resultados obtidos no presente trabalho, com os citados acima, foi possível observar que apenas o lote de IE produzido com *L. monocytogenes* apresentou estabilidade a 35°C, os demais lotes produzidos na mesma matriz avaliada foram considerados não estáveis ou apresentaram tendência de queda na concentração celular nesta temperatura, como observado nesse estudo.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos foi possível concluir que a matriz QMF Ultrafiltrado, a metodologia de produção e o crioprotetor utilizado nesse estudo propiciaram a produção de um lote de IE homogêneo e estável nas temperaturas de estoque estudadas e capaz de ser transportado aos laboratórios participantes de um EP a uma temperatura máxima de 25°C em um período de até seis dias.

O lote de IE produzido nesse estudo foi utilizado em uma rodada de EP com a participação de 28 laboratórios de diferentes estados brasileiros incluindo os Laboratórios Centrais de Saúde Pública. Vinte e sete dos 28 laboratórios participantes, obtiveram resultados satisfatórios (96,4%). Os resultados desse EP podem ser observados no relatório do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de “Alimentos - 6ª Rodada” - Pesquisa de *Salmonella* spp. em Matriz Queijo, disponível na página do INCQS¹⁴. O desempenho dos laboratórios foi considerado excelente, visto que apenas um laboratório apresentou resultado Falso Negativo.

A oferta periódica de programas de EP no Brasil é de grande importância para a verificação da qualidade dos ensaios, tanto para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública, como para laboratórios de pesquisa e privados.



REFERÊNCIAS

1. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4a ed. São Paulo: Varela; 2010.
2. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields P, Bockemühl J, Grimont PAD, et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White- Kauffmann - Le Minor scheme. Res. microbiol. 2010; 161(1): 26-9.
3. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2013 [acessado em 13 jan 2014]. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes->
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial União. 10 jan 2001.
5. Behmer MLA. Tecnologia do leite. 15a ed. São Paulo: Nobel; 1991.
6. Costa JCB. Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Osvaldo Cruz; 2010.
7. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004. [Altera a portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997 que trata do regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal]. Diário Oficial União. 5 mar 2004.
8. Visotto RG, Oliveira MA, Prado SPT, Bergamini AMM. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011;70(1): 8-15.
9. Brandão 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. Ciênc. Rural. 2013;43(10):1905-10. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782013001000028>
10. Janning B, Veld PHI, Mooijman KA, Havelaar AH. Development, production and certification of microbiological reference materials. Fresenius j. anal. chem. 1995; 352: 240-5.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2005.
12. Camargo TSP. Proposta de integração das normas ISO/IEC 17025 e BPL a um software de gerenciamento e controle laboratorial [monografia de graduação]. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá; 2006.
13. Rosas CO, Brandao MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De La Cruz MHC et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. Rev Inst Adolfo Lutz. 2010;69(1):15-22.
14. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 6ª rodada: MIB06/12. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2012.
15. Peterz M, Steneryd AC. Freeze-dried mixed cultures as reference samples in quantitative and qualitative microbiological examinations of food. J Appl Bacteriol. 1993;74:143-8.
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT . NBR ISO/GUIA 30: termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2011.
17. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 2ª rodada: MIB02/11. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2012.
18. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 3ª rodada: MIB03/11. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2012.
19. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 4ª rodada: MIB04/11. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2012.
20. Brandão MLL. Produção de material de referência em matriz queijo para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia; 2012.
21. Philipp WJ, Iwaarden PV, Schimmel H, Meeus N, Kollmorgen N. Development of reference materials for microbiological analysis. Accred. qual. Assur. 2007; 12(3-4): 134-8.
22. 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.
23. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival curves of microbial species stored by freeze-drying. Cryobiology. 2006; 52: 27-32.
24. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003; 46: 205-29.
25. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying. A review. J. microbiol. methods. 2006; 66: 183-93.
26. In't Veld PH. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. Int. j. food microbiol. 1998; 45: 35-41.
27. Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological of food. 4a ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001. p. 69-82.



28. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius j. anal. chem.* 1998; 360: 359-61.
29. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. NBR ISO GUIA 35: Materiais de referência: princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2012.
30. In't Veld PH, Notermans SHW, Berg Van de M. Potential use of microbiological reference materials for the evaluation of detection methods for *Listeria monocytogenes* and the effect of competitors; a collaborative study. *Food microbiol* [periódico da internet]. 1995 [acessado 2012 ago 7]; 12: [cerca de 9 p.]. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80088-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80088-3).
31. Vieira LR, Rosas CO, Brandao MLL, Medeiros VM, Costa JCB, Bricio SML. Desenvolvimento de metodologia para a produção de material de referência em matriz de carne bovina para detecção de *Salmonella* spp. In: Anais do 17º ENAAL e 3º Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos 2011. Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos; 2011. Mato Grosso, Cuiabá.
32. Brandão MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS, Cardarelli-Leite P. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Braz. j. food technol* [periódico na internet]. 2013b [Acesso em: 2013 nov 09]. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br>
33. Brandão MLL, Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, Costa JCB, Pinheiro RR, Cardarelli-Leite P, De La Cruz MHC, Nóbrega AW. Preparation of reference material for proficiency test for enumeration of coliforms in cheese matrix. *Detection*. 2013c; 1: 7-12.
34. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Relatório final do ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos: 4ª rodada: MIB04/11. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2012. duplicata do 19
35. 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; 2000.

Agradecimentos

À Vice Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência da Fiocruz, pela concessão de bolsa à Juliana de Castro Beltrão da Costa no “Programa Inovação Tecnológica” (Inovatec), e ao CNPq, pela bolsa PIBITI concedida à Mariana Ambrósio Andrade Machado durante a realização do presente estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.