

Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos

Development of reference materials for proficiency tests in food microbiology

RIALA6/1251

Carla de Oliveira ROSAS^{1*}, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO¹, Sílvia Maria Lopes BRICIO¹, Valéria de Mello MEDEIROS¹, Samara Pinto Custódio BERNARDO¹, Marcus Henrique Campino DE LA CRUZ², Paola CARDARELLI-LEITE¹

*¹Endereço para correspondência: Departamento de Microbiologia – Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. e-mail: carla.rosas@incqs.fiocruz.br

²Comissão de Ensaio de Proficiência - I Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900

Recebido: 30.10.2009 – Aceito para publicação: 22.03.2010

RESUMO

Ensaio de proficiência (EP) são considerados importantes ferramentas para a condução de programas de controle de qualidade, que possibilitam efetuar a avaliação da habilidade de laboratórios em obter resultados precisos. No Brasil é restrita a oferta de EP na área de microbiologia de alimentos. Além disso, os altos custos diminuem a participação regular de laboratórios nacionais nesses ensaios. O presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação da técnica de liofilização no preparo de materiais de referência (MR) para EP destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* spp. em leite. Foi determinada a concentração do inóculo utilizado no preparo de dois lotes e, também, foi padronizado o procedimento de contaminação da matriz. Para monitorar a qualidade dos MR produzidos foram estabelecidos ensaios de controle, dentre eles o teste da homogeneidade e da estabilidade em longo e curto prazo. A técnica de liofilização mostrou ser adequada para a produção de MR de qualidade e aplicável para EP. Os MR apresentaram estabilidade à temperatura de estoque (-20°C) durante os três primeiros meses, porém foi observada perda de viabilidade após doze meses de armazenamento. Na estabilidade em curto prazo, os MR foram estáveis a 4°C, contudo apresentaram redução significativa no número de células quando mantidos a temperaturas de 25°C e 37°C durante sete dias. **Palavras-chave.** ensaios de proficiência, materiais de referência, microbiologia de alimentos.

ABSTRACT

Proficiency tests are considered relevant tools of quality control programs used to monitor the laboratory performance and to assess the reliability of tests results. In Brazil, the provision of proficiency testing (PT) is restricted to food microbiology area. Furthermore, high costs reduce the regular participation of national laboratories in these tests. This study evaluated the freeze-drying technique employed for preparing reference materials (RM) to be used in the PT schemes for detecting *Salmonella* spp. in milk. The concentration of inoculums used for preparing two batches of RM was determined, and the procedures for matrix contamination were standardized. The control trials were established in order to monitor the quality of the produced RM, and among them, there are long and short-term homogeneity and stability assays. The freeze-drying technique proved to be a suitable procedure for producing RM for PT. The RM were stable for the first three months when stored at -20°C, nevertheless, viability loss could be observed after 12-month storage. The RM were stable at 4°C at short-term stability, although when the products were kept at 25°C and 37°C for seven days, a significant reduction in the number of cells could be observed.

Key words. proficiency testing, reference material, food microbiology.

INTRODUÇÃO

A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios de ensaio promove melhorias nos procedimentos empregados, desde a amostragem até a liberação dos resultados de análises^{1,2}.

Segundo Camargo³, a NBR ISO/IEC 17025:2005⁴ 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 demonstrarem competência técnica e capacidade de produzir resultados tecnicamente precisos, confiáveis e rastreáveis. Dentre os requisitos apontados na Norma, 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.

Ensaio de proficiência são descritos por Roberts², como ferramentas da qualidade, que possibilitam a avaliação da habilidade de um laboratório em obter resultados precisos. A participação em EP permite a comparação do desempenho obtido, com o de outros laboratórios ao analisarem analitos idênticos, específicos para um parâmetro de ensaio⁵.

De acordo com Emons et al⁶, a definição de material de referência (MR) da NBR ISO/GUIA 30:2000⁷ se encontra em processo de revisão, tendo sido recentemente aprovada pelo *Comitê sobre Material de Referência da Organização Internacional de Padronização – ISO REMCO*. Esses MR passam a ser definidos como “*Materiais suficientemente homogêneos e estáveis com relação a uma ou mais propriedades específicas, estabelecidas, para serem utilizados em um processo de medição*”. O documento descreve MR como um termo genérico, com propriedades que podem ser de caráter qualitativo ou quantitativo e que devem apresentar a indicação do uso para apenas uma finalidade em um sistema de medição, como calibrador ou como controle de qualidade.

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^{1,8}. Na produção do MR as células bacterianas são fortemente afetadas por fatores como variações de temperatura e estresse sofrido durante o processo de dessecação^{7,9}.

Quando preparados para serem utilizados em EP, os MR devem ser suficientemente homogêneos e estáveis, garantindo aos laboratórios participantes de um EP o recebimento de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão¹⁰.

O ensaio da estabilidade tem como objetivo a verificação do grau da instabilidade de um material candidato a ser MR. 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 de armazenamento e o teste de estabilidade em curto prazo, que simula as condições de transporte durante a distribuição do material. O teste em curto prazo é realizado com a exposição do material a diferentes temperaturas em diferentes intervalos de tempo¹¹.

Para a avaliação estatística da homogeneidade e da estabilidade, as Normas NBR ISO/IEC GUIA 43-1:1999¹² e a ILAC G13:08/2007¹³ recomendam a utilização dos procedimentos citados por Thompson, Ellison e Wood⁹, as orientações da ISO 13528:2005¹⁴ e da ISO GUIDE 35:2006¹⁰.

Apesar do aumento da procura da participação em EP, a disponibilidade destes ensaios no país é escassa. A grande maioria das ofertas é dada por provedores internacionais, fazendo 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. 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 ultrapassado¹⁵.

O presente trabalho teve como objetivo principal a padronização da metodologia de produção e de controle de MR para EP referente ao ensaio de “*Deteção de Salmonella spp. em alimentos*”, utilizando a técnica de liofilização.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção do material de referência

A partir de um levantamento sobre o sorotipo e fagotipo de *Salmonella* spp. de maior prevalência no Brasil nos últimos anos, foi selecionada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis fagotipo PT-4, isolada de

uma amostra de sobre coxa de frango congelada. Esta foi depositada na Coleção de Pesquisa de Bactérias do INCQS, com número P3440. A caracterização sorológica e a classificação do fagotipo foram realizadas pelo Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ.

A cepa selecionada foi cultivada em caldo infusão cérebro coração (BHI) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 24 horas, 3 mL da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Eppendorf, 5415D). O sedimento obtido foi ressuspenso em 6 mL de solução salina fisiológica contendo peptona a 0,1%, obtendo-se assim a suspensão de células para o preparo do material.

A suspensão de células foi ajustada em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-visible, W-601), em comprimento de onda de 530 nm, até uma transmitância na faixa de 5 a 9%, com o objetivo de se atingir uma concentração aproximada de $5 \text{ a } 9 \times 10^8$ células/mL.

A partir do conhecimento aproximado da concentração de células da suspensão preparada, foi calculado o fator de diluição a ser aplicado, para se obter a concentração desejada no MR liofilizado. A suspensão obtida foi utilizada para o preparo de dois diferentes lotes (S_1 e S_2), que foram liofilizados em diferentes ciclos de liofilização. O procedimento teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade da técnica no preparo de dois diferentes lotes, utilizando uma mesma suspensão de células. A equivalência entre os lotes foi verificada utilizando o programa Microsoft Excel. A partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade foi aplicado o Teste F de equivalência entre as variâncias e posteriormente o Teste t de Student com nível de significância de 5%.

Dois mililitros da suspensão foram homogeneizados com 198 mL de uma solução de Skim Milk a 10%. Volumes de 0,5 mL foram transferidos para 120 frascos de vidro estéreis com capacidade de 4 mL. Após o envase, tampas de borracha estéreis foram encaixadas nos frascos e, em seguida, foram congelados em freezer a -70°C , por um intervalo mínimo de 24 horas. O material foi liofilizado (LIOTOP, K 105) por 24 horas.

Ensaio de controle

Os ensaios de verificação de vácuo, determinação da umidade residual e verificação da pureza foram incluídos no estudo com a intenção de avaliar a qualidade final dos MR liofilizados.

Verificação de vácuo

Logo após a liofilização foi realizada a verificação de vácuo dentro de cada frasco, através da utilização de aparelho emissor de centelha elétrica (Tesla Coil, 2-12-8). Os frascos com vácuo foram lacrados com tampa de metal, etiquetados e estocados em freezer a -20°C .

Determinação da Umidade Residual

Três frascos de cada lote foram utilizados para a determinação da umidade residual por gravimetria, a partir dos procedimentos descritos no POP INCQS 65.3130.001¹⁶. A umidade residual foi calculada pela média dos 3 liófilos analisados.

A avaliação dos resultados foi realizada segundo recomendações do Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products¹⁷, que descreve a faixa percentual de 1 a 3% de umidade residual, como ideal para a maioria dos produtos biológicos liofilizados.

Verificação da pureza

Para a verificação da pureza foram utilizados doze frascos por lote, número correspondente a 10%, conforme recomendações descritas no POP INCQS 65.3230.001¹⁸.

Os liófilos foram reconstituídos com 1 mL de solução salina fisiológica contendo peptona a 0,1%, e deixados em repouso por 15 minutos. Após a reconstituição uma alçada de cada frasco foi semeada em placas 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).

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 ± 2 horas. Após o período de incubação o crescimento nas placas semeadas foi comparado com a morfologia colonial da cepa de referência. Os MR que apresentaram placas com crescimentos de apenas um tipo de colônia e similares à cepa de referência foram considerados puros.

Estudos de homogeneidade

Dez frascos de cada lote, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para o teste da homogeneidade, que ocorreu em um período máximo de 1 mês após a liofilização.

Os liófilos foram reconstituídos, como descrito no ensaio da verificação da pureza, e então homogeneizados com 9 mL de solução salina fisiológica contendo peptona

a 0,1%. Volumes de 1 mL foram transferidos para duas placas de Petri estéreis. A enumeração foi baseada na metodologia descrita por Schulten et al¹⁹.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias. Foram selecionadas placas contendo de 15 a 150 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Para a análise estatística da homogeneidade foram utilizados os procedimentos descritos por Thompson, Ellison e Wood⁹. Primeiramente as contagens das placas foram convertidas em \log_{10} . Em seguida foi aplicado o teste de Cochran aos resultados, com o propósito de eliminar possíveis valores dispersos. Foi então realizada a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel. A avaliação da homogeneidade foi realizada a partir da comparação dos valores de variância entre as amostras (S_{am}^2) e o “c” crítico. Para cada um dos lotes foram atribuídos diferentes valores de desvio padrão (σ_p), de modo a se obter $S_{am}^2 < c$. 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 Thompson²⁰, que estabelecem a relação $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$.

▪ Estudo da estabilidade

O teste de estabilidade em longo prazo foi realizado por 3 meses consecutivos e um ano após o preparo dos lotes. A cada análise mensal, seis frascos, de cada lote, estocados a -20°C foram submetidos à contagem como descrito no estudo da homogeneidade. As médias das contagens realizadas durante os testes da homogeneidade foram utilizadas representando o tempo zero de armazenamento.

Para a avaliação da estabilidade em curto prazo foram utilizados três grupos de quatorze frascos de cada lote. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, foi aplicada a metodologia do “isochronous design”²¹, que recomenda a análise dos analitos sob condições de repetitividade. A cada dia, dois frascos de cada lote foram incubados nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C, em embalagens próprias para transporte de material biológico, com duas unidades de gelo reciclável dentro de cada caixa. 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, sob as mesmas condições de análise descritas anteriormente.

Para a avaliação estatística da estabilidade foi aplicada a metodologia indicada pela ISO GUIDE

35:2006¹⁰, que estabelece a utilização da análise de regressão linear simples para a verificação da relação entre as duas variáveis (concentração x tempo).

Na análise de regressão linear foi utilizado o programa Microsoft Excel, obtendo-se o valor do intercepto, da inclinação e dos intervalos de confiança do intercepto e da declividade.

A partir dos intervalos de confiança da inclinação pôde-se inferir a correlação linear entre a variável explicativa e a de resposta, que segundo Barros, Scarminio e Bruns²² ocorre quando os intervalos de confiança de β diferem de zero, indicando assim a inexistência de relação linear entre as variáveis ao longo do tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da equivalência entre os lotes

Os resultados obtidos mostraram que os materiais foram equivalentes, com nível de significância de 5%, indicando que a técnica de preparo apresentou uma boa reprodutibilidade.

Controles dos lotes produzidos

▪ Verificação do vácuo

O percentual de frascos que apresentaram resultados satisfatórios para vácuo foi de 100% (120 frascos) no lote S_1 e 99,2% (119 frascos) no lote S_2 . Esses resultados confirmam a adequação do sistema de fechamento empregado no final do processo de liofilização.

▪ Verificação da pureza

A verificação da pureza foi satisfatória para os dois lotes analisados evidenciando a ausência de contaminação dos MR produzidos, com bactérias indesejáveis, durante todo o processo de produção dos materiais.

▪ Determinação da umidade residual

As médias das contagens dos três frascos utilizados para umidade residual foram de 2,29 para o lote S_1 e de 2,21 para o lote S_2 . Estes resultados encontram-se em conformidade com preconizado pelo Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products¹¹, que descreve a faixa de 1,0 a 3,0% de umidade residual, como ideal para a maioria dos produtos biológicos liofilizados. Os resultados obtidos demonstram a eficiência do processo de liofilização nos dois ciclos distintos.

■ Estudo da Homogeneidade

Os resultados das contagens obtidas na avaliação da homogeneidade para os dois lotes produzidos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado das contagens (UFC^a/mL) dos lotes S₁ e S₂ no teste de homogeneidade

Frascos	S ₁	S ₂
1	140 e 150	164 e 147
2	167 e 140	152 e 148
3	151 e 168	143 e 130
4	141 e 139	133 e 131
5	144 e 175	154 e 152
6	160 e 176	125 e 119
7	212 e 224	176 e 158
8	170 e 191	159 e 157
9	154 e 160	161 e 153
10	103 e 98	148 e 140

a – Unidade formadora de colônias

Os valores das contagens foram convertidos em log₁₀. O teste de Cochran, não identificou valores dispersos em nenhum dos dois lotes. Os dados obtidos a partir da análise da variância (ANOVA) e os valores de σ_p são citados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores obtidos a partir da análise da variância ANOVA e resultados da avaliação da homogeneidade dos lotes S₁ e S₂

Valores	S ₁	S ₂
Valor do desvio padrão analítico (σ_{an})	0,0344	0,0199
Valor do desvio padrão atribuído (σ_p)	0,27	0,10
Variâncias entre amostras (S_{am}^2)	0,0067	0,0015
Valor crítico do teste de homogeneidade	0,0073	0,0021
Resultado	Homogêneo	Homogêneo

Ao serem aplicados os limites sugeridos por Fearn e Thompson¹⁹ para a avaliação da precisão do teste da homogeneidade ($\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$), foi observado que os lotes preparados obedeceram à relação citada, sendo, portanto, considerados homogêneos (Tabela 2).

O “Food Examination Performance Assessment Scheme–FEPAS”, provedor de EP de alimentos da Inglaterra, utiliza o valor de σ_p de 0,25 para avaliação da homogeneidade dos MR produzidos e para o cálculo do Z-score a ser aplicado na avaliação dos resultados dos EP. Ao serem comparados os valores de σ_p obtidos neste estudo, foi verificada a proximidade com o limite utilizado pelo FEPAS, indicando que os procedimentos aplicados para a obtenção de MR homogêneos foram adequados (Tabela 2).

A comparação dos resultados obtidos no teste da homogeneidade, com a de outros estudos, foi dificultada pela diversidade dos testes estatísticos utilizados para esta avaliação. Peterz e Steneryd²³ obtiveram resultados satisfatórios para a homogeneidade de MR preparados pela técnica de liofilização ao utilizarem o teste-F. Beckers et al²⁴, In’t Veld²⁵ e In’t Veld, e Van Strijp-Lockefeer²⁶ verificaram a homogeneidade dos MR produzidos pela técnica de spray-dryer utilizando a distribuição de “Poison”.

■ Estudo da Estabilidade

Como os lotes produzidos foram considerados equivalentes, a verificação da estabilidade em longo e curto prazo foi realizada com as médias das contagens dos dois lotes.

Os resultados das médias das contagens da estabilidade em longo prazo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Médias das contagens (UFC^a/mL) dos lotes S₁ e S₂ obtidas no estudo da estabilidade em longo prazo

Frascos	1º mês	2º mês	3º mês	12º mês
1	1275	1260	910	528
2	1615	1185	845	468
3	1140	1075	770	393
4	1290	1405	840	398
5	1165	1315	825	665
6	1045	1385	910	483

a - Unidade formadora de colônias

A análise estatística de regressão aplicada aos dados indicou que os MR produzidos se mantiveram estáveis durante o período inicial do estudo de 3 meses à temperatura de -20°C (Figura 1). Entretanto, após um ano de estoque foi evidenciada queda na viabilidade do número de células, acarretando na instabilidade dos MR. Diferentemente, Janning et al⁸ descreveram a temperatura de -20°C como adequada para o estoque de MR contendo *S. typhimurium* produzido pela técnica de spray-dryer por um período de 4 anos sem apresentarem perdas expressivas na viabilidade das células.

A média da concentração de células dos lotes S₁ e S₂ ao longo de 3 meses se encontra na Figura 1. Os valores dos limites de confiabilidade de 95% do coeficiente angular de inclinação da análise de regressão linear, que definem a estabilidade do material, estão descritos abaixo da figura.

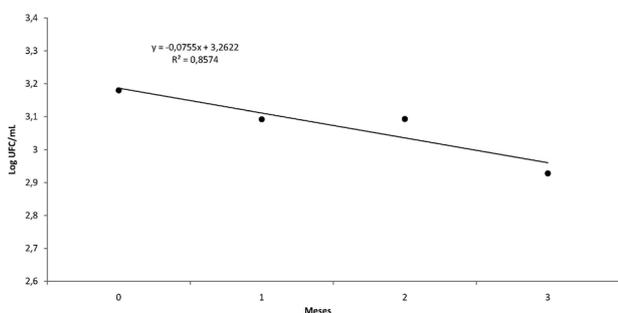


Figura 1. Variação das médias de concentração de células, dos lotes S₁ e S₂, ao longo de 3 meses de estoque a -20°C

Limites de confiabilidade 95%: Inferiores (-0,169228122), Superiores (0,018187555)

Resultado: Estável em três meses de estoque.

Cabe ressaltar que resultados do teste da estabilidade em longo prazo indicando queda na concentração de uma característica estudada, não devem ser considerados como limitantes para a utilização de MR. No entanto, se faz necessário a realização deste controle durante todo o período de uso do material, a fim de verificar se a perda da estabilidade ocorre de forma homogênea.

O estudo da estabilidade em curto prazo revelou as perdas das concentrações de células ocorridas diariamente nas diferentes temperaturas (Tabela 4). A análise estatística de regressão linear foi aplicada aos dados obtidos.

Tabela 4. Médias das contagens (UFC^a/mL) dos lotes S₁ e S₂ obtidas no estudo da estabilidade em curto prazo nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C

Tempo de incubação (dias)	Temperatura de transporte		
	4°C	25°C	37°C
1	306	590	450
2	375	300	150
3	398	180	70
4	261	140	30
5	440	110	20
6	305	80	10
7	410	40	1

a - Unidade formadora de colônias

O perfil da variação na concentração de células dos lotes estudados ao longo de 7 dias nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C se encontra na Figura 2. Os valores dos limites de confiança de 95%, que definem a estabilidade do material para cada uma das temperaturas estudadas estão descritos abaixo da figura.

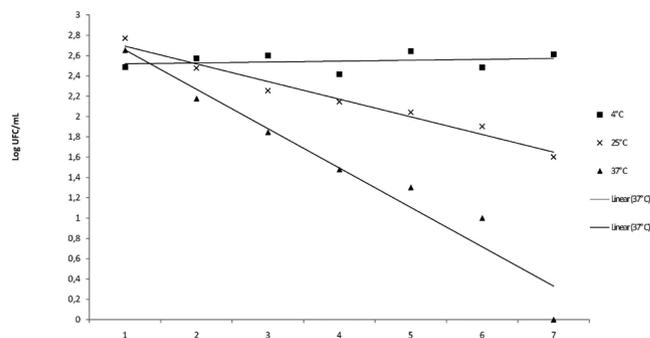


Figura 2. Gráfico de regressão linear das médias de concentração de células, dos lotes S₁ e S₂, durante simulação de transporte nas temperaturas de 4°C, 25°C e a 37°C, por 7 dias

Limites de confiabilidade 95%

Temperatura de 4°C: Inferiores (-0,034509455); Superiores (0,052030458) – Estável;

Temperatura de 25°C: Inferiores (-0,209614679); Superiores (-0,13812235) – Não Estável;

Temperatura de 37°C: Inferiores (-0,493462371); Superiores (-0,281958207) – Não Estável.

Foi verificado que dentre as temperaturas estudadas, a de 4°C seria a ideal para o transporte dos lotes, uma vez que os resultados estatísticos obtidos indicaram a manutenção da concentração de células dos MR durante os sete dias. Porém, a média das contagens na temperatura de 4°C foi de 410 UFC/mL no sétimo dia de transporte, concentração ideal para ensaios quantitativos.

Para ensaios microbiológicos qualitativos, a concentração de células deve ser reduzida objetivando a verificação da capacidade do laboratório na detecção do microrganismo pesquisado. Estudos do limite mínimo de detecção (LMD) para a pesquisa de *Salmonella* em alimentos são descritos na literatura. Bricio²⁷, utilizando a metodologia do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, obteve LMD de 12 UFC/25 g de alimento. Nunes²⁸, ao estudar o LMD com culturas de *Salmonella* utilizando metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), encontrou valores de LMD variando entre 1 a 8 UFC/25 mL. Desta forma, sugerimos que MR para ensaios qualitativos a serem transportados a 4°C devem ser preparados com suspensões de células em concentrações mais baixas que as utilizadas neste estudo.

O envio desses materiais, à temperatura ambiente, para laboratórios localizados em diferentes regiões do país acarretaria no recebimento de MR com diferentes concentrações de células, o que comprometeria a correta avaliação dos resultados de um EP.

A Figura 3 ilustra o percentual de perdas de viabilidade do número de células verificadas nos materiais produzidos ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de transporte.

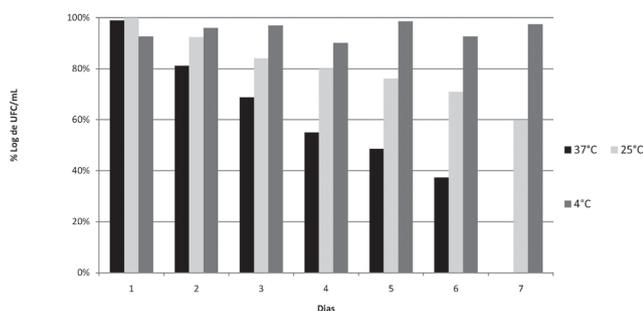


Figura 3. Percentual de perda diária, da média dos lotes S₁ e S₂, durante simulação de transporte nas temperaturas de 4°C, 25°C e a 37°C

Os dados indicam uma perda expressiva na concentração de *Salmonella* spp. já no segundo dia de

transporte a 25°C e a 37°C, com médias percentuais de perda de viabilidade de 10% e 19%, respectivamente. As perdas a 37°C se acentuaram nos dias subsequentes, chegando a apresentar percentuais de 50% no 5º dia e acima de 90% no 7º dia.

In't Veld²⁴ avaliou, semanalmente, a estabilidade de MR contendo *Salmonella* Panama, preparado pela técnica de spray-dryer mantido nas temperaturas de 22°C, 30°C e 37°C. 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.

Ao compararmos os resultados encontrados com os descritos no estudo acima, observamos que as médias de perdas apresentadas pelos MR liofilizados e mantidos a 25°C e 37°C por 7 dias, foram bem mais elevadas (40% e 99%, respectivamente) que as indicadas com MR preparados pela técnica de spray-dryer. Tais resultados sugerem que os MR produzidos por spray-dryer sejam mais estáveis nas faixas de temperatura estudadas do que os MR liofilizados.

CONCLUSÃO

A técnica de liofilização foi considerada adequada para a produção de MR de qualidade e aplicável a EP.

Os MR apresentaram estabilidade à temperatura de estoque (-20°C) durante os três primeiros meses, porém, foi observada perda de viabilidade após um ano de armazenamento.

Os resultados do teste de estabilidade em curto prazo mostraram que os MR se mantiveram estáveis apenas na temperatura de 4°C, limitando o transporte do MR a essa temperatura. Entretanto, transporte de materiais a baixas temperaturas constitui uma prática complicada e de custo bastante elevado. Desta forma, outras temperaturas entre 4°C e abaixo de 25°C poderiam ser estudadas.

Novos estudos são necessários na tentativa de induzir a tolerância das células bacterianas às variações de temperatura durante o transporte de MR destinados a EP.

AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro ao Projeto: "Comparações Interlaboratoriais em Microbiologia de Alimentos".

Ao Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Bactérias de Referência do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS

1. Hayes D. Quality assurance in the microbiology laboratory. *Accredit Qual Assur*. 1996; 1: 18-23.
2. Roberts D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Arh Hig Rada Toksikol J*. 1999; 50(1): 55-65.
3. Camargo, TSP. Proposta de Integração das Normas ISO/IEC 17025 e BPL a um Software de Gerenciamento e Controle Laboratorial. [monografia de graduação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Itajubá, 2006.
4. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.
5. Rosengren A, Heneryd AC. Proficiency testing schemes – their role in quality assurance. *Int J Food Microbiol*. 1998; 45: 55.
6. Emons H, Fajgelj A, Van der Veen AMH, Watters R. New definitions on reference materials. *Accredit Qual Assur*. 2006; 10: 576-8.
7. NBR ISO/GUIA 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.
8. Philipp WJ, Iwaarden PV, Schimmel H, Meeus N, Kollmorgen N. Development of reference materials for microbiological analysis. *Accredit Qual Assur*. 2007; 12: 134-8.
9. Janning B, Veld PHL, Mooijman KA, Havelaar AH. Development, production and certification of microbiological reference materials. *Fresenius J Anal Chem*. 1995; 352: 240-5.
10. 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.
11. International Organization for Standardization – ISO GUIDE 35. Reference Materials – General and statistical principles for certification. 2006.
12. NBR ISO/IEC GUIA 43-1. Ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais - Parte 1 - Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT, 1999.
13. ILAC-G 13:08/2007. Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes. ILAC, 2007.
14. International Organization for Standardization – ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Oficina Sobre Ensaios 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.
16. 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).
17. Food and Drug Administration – FDA, Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products. 1990. [Acesso em 17 Nov. 2008.]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Cber/gdlns/moisture.htm].
18. 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).
19. Schulten SM, in 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 507 R. European Commission, bcr information, 2000.
20. Fearn T, Thompson M. A new test for “sufficient homogeneity”. *Analyst*. 2001; 126: 1414-7.
21. 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.
22. Barros NB, Scarminio IS, Bruns RE. Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 2 ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2003.
23. Peterz M, Norberg P. Freeze dried mixed cultures as samples for proficiency tests and collaborative studies in food microbiology. *J Assoc Anal Chem*. 1983; 66(6): 1510-3.
24. Beckers HJ, Van Lesden FM, Meijssen MJM, Kampelmacher EH. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of *Salmonella* in food and feeding stuffs. *J Appl Bacteriol*. 1985; 59: 507-12.
25. In't Veld, PH. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. *Int J Food Microbiol*. 1998; 45(1): 35-41.
26. In't Veld PH, Havelaar AH, Van Strijp-Lockefeer NGWM. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. *J Appl Bacteriol*. 1999; 86: 266-74.
27. Bricio SML. 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. [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
28. Nunes FFV. Limite Mínimo de Detecção de Métodos de Análise de *Salmonella* spp. para Alimentos: Uma Contribuição Metodológica. [dissertação de mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006.