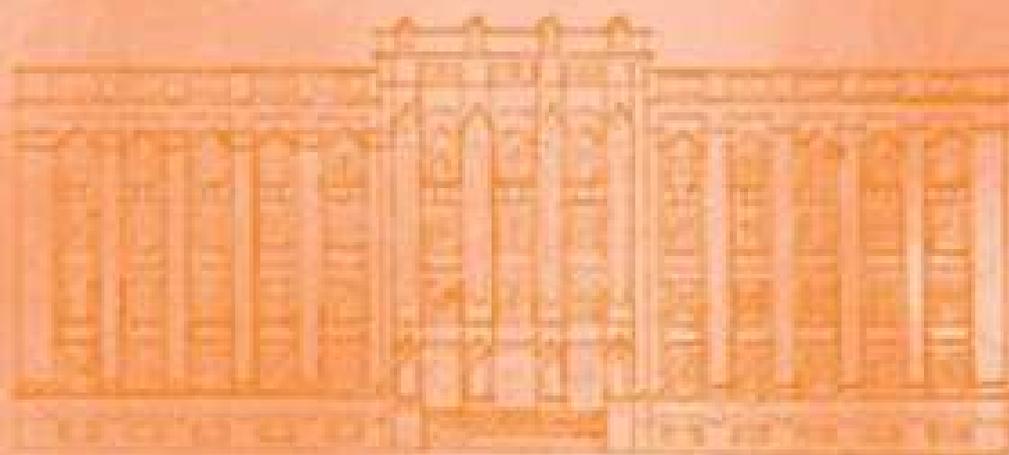


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 72 número 2, 2013



Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

Volume 72 número 2, 2013  
abril - junho 2013

Publicação trimestral/Quarterly publication  
Solicita-se permuta/Exchange desired

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

### Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

### Editor Adjunto

Adriana Bugno

### Editores Assistentes

Neuza Kasumi Shirata Iso  
Aurea Silveira da Cruz Garçon  
Christiane Asturiano Ristori Costa  
Gisele Letícia Alves  
Iracema de Albuquerque Kimura  
Jacqueline Tanury Macruz Peresi  
Lucile Tiemi Abe Matsumoto  
Márcia Liane Buzzo  
Raquel dos Anjos Fazioli  
Sérgio Dovidauskas  
Virginia Bodelão Richini Pereira  
Thales de Brito  
Lílian Nunes Schiavon  
Sylia Rehder

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

---

## Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.  
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.  
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.  
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.  
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.  
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.  
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.  
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.  
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.  
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.  
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.  
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.  
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.  
John Gilbert, York, UK.  
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.  
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.  
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.  
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.  
Martin Emilio Munk, Copenhague, Dinamarca.  
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.  
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.  
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.  
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.  
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.  
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.  
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.  
Vanessa Yardley, London, UK.  
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.  
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.  
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

---

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
(Secretaria de Estado da Saúde)  
São Paulo, SP – Brasil

1941  
2013, 72(2)

ISSN 0073-9855      CDD<sub>18</sub> 614.07205

RIALA 6  
ISSN 1983-3814 versão *on line*  
ISSN 2176-3844 CD-ROM

(\* ) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://revista.ial.sp.gov.br>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1551 **Importância do teste de avidéz da imunoglobulina G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* no diagnóstico da toxoplasmose em gestantes**  
Improving the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women by using anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G (IgG) avidity determination  
Licinia de Toledo PENA, Michelle Garcia DISCACCIATI ..... 117-123

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1552 **Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência**  
Evaluation of cryoprotectants in the production of reference material for coliforms counting in milk powder to be used for proficiency testing  
Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Carla de Oliveira ROSAS, Silvia Maria Lopes BRICIO, Juliana de Castro Beltrão da COSTA, Valéria de Mello MEDEIROS, Márcia Barbosa WARNKEN, Marcus Henrique Campino de La CRUZ, Armi Wanderley NOBREGA ... 124-130
- 1553 **Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria**  
Caracterização de bactérias lácticas em queijo de coalho e antagonismo a alguns patógenos  
Wilma Carla de FREITAS, Antônio Eustáquio Resende TRAVASSOS, Janeeyre Ferreira MACIEL ..... 131-137
- 1554 ***In vitro* biofilm production by *Staphylococcus* spp. strains isolated from finger-foods and snacks**  
Produção *in vitro* de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolados de salgadinhos e lanches  
Sarah Hwa In LEE<sup>1</sup>, Carlos Henrique CAMARGO, Elisângela de Souza MIRANDA, Ary FERNANDES JUNIOR, Vera Lúcia Mores RALL ..... 138-141
- 1555 **Desenvolvimento e avaliação físico-química, sensorial e da estabilidade de ácido ascórbico de doce de leite com pimenta**  
Development of red pepper-containing dulce de leche and evaluation of its physico-chemical and sensorial characteristics, and ascorbic acid stability  
Camila Pegorer MAZINI, Gabriella Giani PIERETTI, Ivanise Guilherme BRANCO, Monica Regina da Silva SCAPIM, Grasielle Scaramal MADRONA ..... 142-146
- 1556 **Avaliação da qualidade do camarão salgado seco (aviú) e da farinha de peixe (piracuí) comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém, Pará**  
Microbiological and physico-chemical qualities of dried-salted shrimp (“aviú”) and of “piracuí” type fish meal sold in retail markets in Belém, Pará – Brazil  
Emilia do Socorro Conceição de Lima NUNES, Ruth Helena Falesi Palha de Moraes BITTENCOURT, Moacir Cerqueira da SILVA, Eliane Teixeira MÁRSICO, Robson Maia FRANCO ..... 147-154
- 1557 **Prevalência de contaminação bacteriana em estetoscópios**  
Prevalence of bacteria contamination on stethoscopes  
Lauro Gilvan Batista DUTRA, Henrique Borges do Nascimento NETO, Fúlvio Borges NEDEL, Eduardo Alexis LOBO ..... 155-160

---

■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

- 1558 Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana**  
Inconsistent results in real-time PCR in analyzing samples from patients with suspected bacterial meningitis  
Maristela Marques SALGADO, Maria Gisele GONÇALVES, Fabio Takenori HIGA, Lucila Okuyama FUKASAWA, Priscilla Lima de OLIVEIRA, Carla Naufal da SILVA, Claudio Tavares SACCHI..... 161-164
- 1559 Intralaboratory assessment of analysts' proficiency for carotenoid analysis using a certified reference material**  
Avaliação intralaboratorial do desempenho de analistas na análise de carotenoides utilizando material de referência certificado  
Cintia Nanci KOBORI, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA ..... 165-169
- 1560 Avaliação da contaminação microbiana em produtos desinfetantes de uso geral**  
Microbial contamination in household disinfectant products  
Rodrigo Rollin PINHEIRO, Bruna Peres SABAGH, Livia Maria Rubem VIDAL, João Flávio Carneiro VERAS, Verônica Viana VIEIRA, Aline da Silva Soares SOUTO, Daniela Cristina Rodrigues PEREIRA, Marta de Campos NEVES, Maria Helena Simões VILLAS BOAS..... 170-174
- 1561 Prevalência de enteroparasitas em crianças atendidas em unidades básicas de saúde em uma cidade do sul do Brasil**  
Prevalence of enteroparasites in children attended at basic health unities in a Brazilian southern city  
Taís MATA-SANTOS, Fabiane dos Anjos GATTI, Carolina Silveira MASCARENHAS, Lourdes Helena MARTINS, Hilton Antônio MATA-SANTOS, Juliana Montelli FENALTI, Isabel Cristina de Oliveira NETTO, Raúl Andrés MENDOZA-SASSI, Carlos James SCAINI..... 175-178
- INSTRUÇÕES AOS AUTORES..... 179-184

# Importância do teste de avidéz da imunoglobulina G (IgG) anti-*Toxoplasma gondii* no diagnóstico da toxoplasmose em gestantes

## Improving the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women by using anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin G (IgG) avidity determination

RIALA6/1551

Licinia de Toledo PENA, Michelle Garcia DISCACCIATI\*

\*Endereço para correspondência: Universidade Paulista - Campus Swift, Av. Comendador Enzo Ferrari, 280  
CEP: 13043-900, Campinas (SP). Tel.: (19) 3776-4000. E-mail: michelle.garciadisc@gmail.com  
Recebido: 10.10.2012 – Aceito para publicação: 06.05.2013

### RESUMO

A toxoplasmose é protozoose de ampla distribuição geográfica. A infecção congênita por *Toxoplasma gondii* pode ser grave e até letal, por isso, é fundamental que se inicie o pré-natal no primeiro trimestre da gestação, o qual possibilita o diagnóstico precoce. Ao evidenciar sorologia positiva para imunoglobulina M, torna-se necessária a realização de exames confirmatórios complementares, como o teste de avidéz de imunoglobulina G específico para *Toxoplasma gondii*, que é útil na identificação da fase em que se encontra a doença. Na presente revisão, foi avaliada a importância da utilização do teste de avidéz de anticorpo IgG anti-*T. gondii* na rotina pré-natal para diagnóstico de toxoplasmose aguda, pesquisando-se os periódicos indexados nas bases de dados Lilacs, SciELO e PubMed. A maioria dos estudos demonstra que, ao definir a fase da doença com maior precisão, o teste de avidéz de IgG tem implicação direta na melhora da conduta terapêutica para pacientes com anticorpos IgM reagentes para *T. gondii* durante a gestação. A implantação desse teste na triagem pré-natal no âmbito nacional ainda necessita de um esforço conjunto para se tornar uma estratégia eficiente de controle da toxoplasmose gestacional e congênita.

**Palavras-chave.** toxoplasmose congênita, *Toxoplasma gondii*, afinidade de anticorpos, avidéz de IgG, ensaios imunoenzimáticos, teste de avidéz de imunoglobulina G anti-*T. gondii*.

### ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease worldwide distributed. Congenital infection with *Toxoplasma gondii* can be serious and even lethal, so it is essential to initiate the prenatal care in the first trimester of pregnancy, for achieving early diagnosis. When the *Toxoplasma* immunoglobulin-M serology is positive, the additional confirmatory tests are required, such as testing for *T. gondii* specific immunoglobulin-G avidity, which is useful for identifying the acute toxoplasmosis from the past infection. The present study performed a review on the use of IgG avidity test for toxoplasmosis diagnosis during pregnancy, by consulting journals indexed in Lilacs, SciELO and PubMed databases. The anti-*Toxoplasma* IgG avidity test is capable to set the disease phase with high accuracy, and it is directly associated with the best clinical practice for patients with positive anti-*Toxoplasma gondii* IgM antibody during pregnancy. The implementation of this test in prenatal screening in a national context requires a joint effort to establish an effective strategy to control the gestational toxoplasmosis.

**Keywords.** congenital toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, antibody affinity, IgG avidity, immunoassays, immunoglobulin G anti-*T. gondii* avidity test.

## INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma protozoose de ampla distribuição geográfica, cujo agente etiológico é o *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), o qual possui um ciclo de vida que envolve o gato como hospedeiro definitivo e o homem, os mamíferos e as aves como hospedeiros intermediários<sup>1</sup>. Existem inúmeras formas de transmissão, destacando-se a ingestão de oocistos dispersos no ambiente, na água e nos alimentos; a ingestão de carnes mal cozidas de suínos, bovinos e ovinos contendo cistos; e a transmissão placentária<sup>1,2</sup>.

A prevalência de toxoplasmose é alta em nossa população, podendo variar de 64,9 % a 91,6 %, dependendo da região do Brasil<sup>3,4</sup>. Esses dados assumem uma grande importância, principalmente quando consideramos a transmissão vertical da toxoplasmose e suas graves consequências congênitas. Em um estudo realizado em Campinas em 2004, foi observada taxa de prevalência de 56,1 % nas gestantes do Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>5</sup>. Recentemente, um estudo envolvendo mais de 4.200 mulheres atendidas no serviço de saúde pública em duas cidades do Paraná (Brasil) encontrou 60 % de prevalência de IgG anti-*Toxoplasma gondii*<sup>6</sup>. Tais dados reforçam a importância de monitoramento adequado das gestantes, sendo fundamental que se inicie o pré-natal no primeiro trimestre da gestação, possibilitando a identificação precoce dos casos agudos de toxoplasmose gestacional. Ao se diagnosticar precocemente, o tratamento tem maiores chances de evitar ou reduzir sequelas para o recém-nascido<sup>7</sup>.

Uma vez que o diagnóstico clínico e o parasitológico da toxoplasmose são difíceis, por tratar-se de um processo sistêmico com baixa parasitemia e sintomas inespecíficos, o diagnóstico da doença aguda é realizado pelo perfil sorológico, que exhibe positividade tanto para anticorpos da classe imunoglobulina M (IgM) quanto imunoglobulina G (IgG)<sup>8</sup>. Os níveis de anticorpos IgM podem manter-se positivos por meses após a infecção, resultando em testes falso-positivos para toxoplasmose aguda, por isso existe a necessidade da utilização de outros métodos para a diferenciação entre infecção aguda ou crônica, como o teste de avidéz de IgG específico para *T. gondii*<sup>7,8</sup>. Entretanto, um estudo conduzido em 2010 por Jones e colaboradores demonstrou que 73,2 % dos obstetras entrevistados não tinham conhecimento de que o teste de IgM para toxoplasmose apresenta altas taxas de resultados falso-positivos, e ainda foi demonstrado nesse estudo que

91,2 % dos obstetras não tinham ouvido falar do teste de avidéz, o qual pode ajudar a determinar a fase da infecção por *T. gondii* na gravidez<sup>9</sup>.

Devido à grande importância clínica da transmissão placentária da toxoplasmose, esta revisão narrativa da literatura tem como objetivo avaliar a utilidade clínica do teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii* para o diagnóstico da toxoplasmose aguda em gestantes, a fim de fornecer maiores informações sobre o assunto para os profissionais da área da saúde.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para atender aos objetivos deste trabalho, foi realizada uma busca de artigos científicos indexados nas bases de dados Lilacs, SciELO e PubMed, utilizando como descritores de busca em português: toxoplasmose congênita; *Toxoplasma gondii*; afinidade de anticorpos; teste de avidéz de IgG; ensaios imunoenzimáticos; teste de avidéz de imunoglobulina G anti-*T. gondii*, assim como os correspondentes desses termos em inglês: congenital toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, antibody affinity, IgG avidity, immunoassays, immunoglobulin G anti-*T. gondii* avidity test.

Como critérios de inclusão foram adotados: artigos que fossem originais, artigos que tenham avaliado a avidéz de IgG para o diagnóstico da toxoplasmose aguda entre os anos de 2004 e 2013, artigos cuja população-alvo era composta de gestantes ou pacientes com toxoplasmose. Primeiramente, foi realizada uma seleção a partir da leitura dos títulos e dos resumos, para verificar se os artigos atendiam aos critérios estabelecidos para responder à temática proposta. Após essa primeira seleção, o artigo selecionado foi estudado na íntegra pelos autores deste trabalho.

Para redigir esta revisão narrativa, iniciamos com uma abordagem geral, abrangendo conceitos sobre a patogenia da toxoplasmose, sua importância na gestação e formas de diagnósticos, utilizando as informações presentes nos artigos científicos selecionados e alguns livros didáticos. Após essa primeira abordagem conceitual, avaliamos artigos originais indexados nas bases de dados supracitadas e que tratavam especificamente da utilidade do teste de avidéz de IgG anti-*Toxoplasma gondii* para diagnóstico da toxoplasmose aguda, assim como sua importância na rotina pré-natal de gestantes. Para uma melhor visibilidade e clareza dessas informações, esses dados foram sumarizados e organizados no quadro 1.

## PATOGENIA

Nos humanos, o *Toxoplasma gondii* possui alta infectividade e baixa patogenicidade<sup>10</sup>. Quando um indivíduo imunocompetente é acometido por esse agente, normalmente a infecção é assintomática e seu curso é benigno, com cura espontânea na maioria dos casos. Aproximadamente 10 % a 20 % dos adultos infectados, no entanto, apresentam alguns sintomas na fase aguda da doença, porém essa fase sintomática em indivíduos imunocompetentes é autolimitada<sup>10</sup>.

A patogenia da toxoplasmose pode simular mononucleose infecciosa, na qual o indivíduo apresenta calafrios, febre, cefaleia, mialgia, linfadenite e extrema fadiga. Em infecções graves, que ocorrem principalmente em indivíduos imunodeprimidos, pode haver também erupção maculopapular, hepatite, encefalomielite ou miocardite. Em alguns casos, ocorre retinocoroidite, podendo levar à cegueira<sup>11</sup>. A evolução clínica da toxoplasmose aguda, com exceção do comprometimento ocular, é favorável, embora os sintomas possam persistir por meses ou até mesmo por anos<sup>2,11</sup>.

## Toxoplasmose congênita ou pré-natal

Na transmissão placentária, o feto é infectado por taquizoítas que cruzam a placenta durante a infecção primária. Em gestantes imunodeprimidas, o ciclo de vida do parasita pode ser reiniciado em cistos teciduais dormentes de infecções passadas. Raramente isso ocorre em gestantes imunocompetentes<sup>12</sup>.

O risco de transmissão materno-fetal, bem como a gravidade das sequelas, está relacionado com a idade gestacional em que ocorre a soroconversão materna. No primeiro trimestre da gestação, pode ocorrer aborto com frequência dez vezes maior em gestantes com sorologia positiva para toxoplasmose. No segundo trimestre, além de aborto, existe a possibilidade de ocorrer nascimento prematuro e a criança apresentar-se normal ou com graves anomalias. No terceiro trimestre de gestação, a criança pode nascer normal e apresentar evidências da doença em dias, semanas ou meses após o nascimento. De maneira geral, há comprometimento ganglionar generalizado, hepatoesplenomegalia, edema, miocardite, anemia, trombocitopenia e lesões oculares<sup>1,2</sup>.

A toxoplasmose congênita é uma das formas mais graves da doença, provocando sintomas enquadrados dentro da “Síndrome ou Tétrade de Sabin”, caracterizada

por: coriorretinite, calcificações cerebrais, perturbações neurológicas, retardamento psicomotor e alterações no volume craniano – micro ou macroencefalia.<sup>1,2</sup>

## DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

Podemos citar os métodos parasitológicos e imunológicos como as duas principais formas de diagnóstico de toxoplasmose. O método parasitológico consiste, por exemplo, na demonstração do taquizoíto em amostras como líquido amniótico e sangue, durante a fase aguda<sup>3</sup>. O diagnóstico imunológico da toxoplasmose é realizado pela pesquisa sorológica dos anticorpos de fase aguda (IgM) e crônica (IgG), e menos frequentemente, na pesquisa de IgE e IgA<sup>13,14</sup>. Para tanto, existem diferentes técnicas imunológicas preconizadas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose, dentre as quais podemos citar: técnica de Sabin-Feldman, a Imunofluorescência Indireta (IFI), a Hemaglutinação (HA), a fixação de complemento (FC), o imunensaio-enzimático (ELISA), Imunoblot e ensaios de aglutinação (Immunosorbent agglutination assay, ISAGA)<sup>1,13-15</sup>.

Dentre esses testes, podemos destacar que as reações imunoenzimáticas ELISA (Enzyme Linked ImmunSorbent Assay) e ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) apresentam alta sensibilidade e especificidade. Os testes por ELFA-Imunocaptura para IgM e a detecção da avidéz de IgG para toxoplasmose têm utilidade para diferenciar toxoplasmose aguda dos casos de contágio recente com alguns meses de evolução<sup>16</sup>.

Já o diagnóstico da infecção fetal é mais difícil, necessitando de procedimentos clínicos mais especializados, como a cordocentese e amniocentese. A cordocentese é realizada até a vigésima segunda semana de gestação para pesquisa de anticorpos IgM. Além disso, existe a possibilidade de realização da reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction, PCR) no líquido amniótico, que apresenta uma alta sensibilidade<sup>1,2</sup>.

O diagnóstico da infecção materna é realizado pelo perfil sorológico da doença. Existe para essa finalidade a possibilidade de se utilizar amostras coletadas em papel de filtro e posteriormente analisadas pelo teste de ELISA<sup>8</sup>. A pesquisa sorológica pode exibir positividade tanto para IgG quanto para IgM, entretanto, ao ser identificado IgM na triagem inicial da gestante, outros testes de diferenciação entre fase aguda e crônica devem ser utilizados.

**Quadro 1.** Características gerais e conclusão de estudos publicados e indexados no Lilacs, SciELO e PubMed no período de 2004 a 2013 sobre a utilidade do teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii* no diagnóstico da toxoplasmose aguda

Estudo	Desenho do estudo	Característica do estudo	Conclusão
Deshpand et al. (2013) <sup>25</sup>	Transversal	Avaliou 20 pacientes com toxoplasmose aguda, 10 com infecção crônica e 10 com diagnóstico indeterminado	A distinção entre toxoplasmose aguda e crônica é possível por meio da determinação de avidéz de IgG pela técnica de Western blot.
Yamada e cols. (2011) <sup>20</sup>	Prospectivo	Estudo prospectivo que incluiu 146 gestantes com teste sorológico positivo para IgM.	O rastreamento da toxoplasmose congênita com a combinação do teste de avidéz de IgG no sangue materno e PCR no líquido amniótico é útil para identificar gravidez de alto risco e toxoplasmose congênita.
Souza-Junior e cols. (2010) <sup>19</sup>	Transversal	Estudo transversal que incluiu gestantes com diagnóstico sorológico de toxoplasmose apresentando IgM positiva.	Nas gestantes com IgM anti- <i>T. gondii</i> positiva, o resultado do teste de avidéz de IgG associou-se à presença ou à ausência de infecção congênita, com elevado valor preditivo negativo (ausência de infecção fetal/neonatal quando a avidéz era alta).
Canales et al. (2010) <sup>21</sup>	Transversal	Inclui 35 mulheres com diagnóstico clínico de toxoplasmose aguda e crônica.	O teste de avidéz de IgG pode ser útil para o diagnóstico de toxoplasmose aguda e tem 100% de concordância com o teste de referência (IgM qualitativa + IgG quantitativa).
Araújo e cols. (2008) <sup>17</sup>	Transversal	Avaliou a avidéz de IgG para estabelecer um perfil de infecção recente aguda em uma única amostra de soro e confirmar a presença de anticorpos IgM residuais nos ensaios automatizados.	A avidéz de IgG é um importante marcador imunológico para distinguir infecção recente e determinar a presença de IgM residual.
Iqbal e cols. (2007) <sup>22</sup>	Transversal	Incluiu 224 gestantes no primeiro trimestre de gestação.	A combinação de um teste comercial para avidéz de IgG e para IgG/IgM é válida para excluir infecção por <i>T. gondii</i> em curso ou recém adquirida em gestantes no primeiro trimestre da gestação e diminui significativamente a necessidade de testes no seguimento ou a intervenção terapêutica desnecessária.
Candolfi e cols. (2007) <sup>23</sup>	Transversal	Os autores avaliaram dois grupos de sujeitos: 36 gestantes com toxoplasmose aguda e 55 pacientes com toxoplasmose crônica.	O teste de avidéz IgG pode ser usado na distinção entre infecção crônica e aguda na primeira amostra de uma mulher grávida, desde que não haja imunodepressão subjacente e tratamento em curso.
Figueiró-Filho e cols. (2005) <sup>8</sup>	Prospectivo longitudinal	Estudo prospectivo longitudinal com 32.512 gestantes submetidas à triagem pré-natal.	O teste de avidéz de IgG, quando associado à idade gestacional e à data de realização do exame mostrou-se útil para orientar a terapêutica e avaliar o risco de transmissão vertical, permitindo afastá-lo quando havia avidéz elevada previamente a 12 semanas.
Tanyuksel e cols. (2004) <sup>24</sup>	Transversal	Incluiu 104 mulheres e homens com sintomas de toxoplasmose e também gestantes com suspeita de toxoplasmose no primeiro trimestre de gestação.	A determinação da avidéz de IgG é uma ferramenta útil para diagnóstico da toxoplasmose ocular e é um método seguro para rastreamento da toxoplasmose no primeiro trimestre da gestação.

IgG = imunoglobulina G; IgM = imunoglobulina M; PCR = reação em cadeia da polimerase; *T. gondii* = *Toxoplasma gondii*

### Utilidade do Teste de Avidéz de IgG para diagnóstico da toxoplasmose aguda

Anticorpos da classe IgM contra o toxoplasma são frequentemente utilizados como marcador sorológico da fase aguda da toxoplasmose<sup>1,2</sup>. Porém, outros métodos de auxílio diagnóstico, como o teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii*<sup>17</sup>, devem ser utilizados para definir a fase da infecção. Isso é devido ao fato de que os títulos de anticorpos específicos da classe IgM aumentam rapidamente logo após a infecção na fase aguda e, após alguns meses, começam a declinar, podendo persistir por um ano ou mais na circulação, o que ocasiona resultado falso-positivo para a infecção aguda<sup>18,19</sup>.

O quadro 1 relaciona alguns estudos sobre a utilidade do teste de avidéz de IgG para o diagnóstico de toxoplasmose<sup>8,17,19,20-25</sup>. Esse teste avalia a avidéz de ligação do antígeno aos anticorpos IgG contra antígenos de *T. gondii*, permitindo a separação dos anticorpos produzidos na fase inicial da infecção (os de baixa avidéz), dos anticorpos que indicam infecção crônica (os de alta avidéz). A afinidade funcional dos anticorpos IgG pelos antígenos é baixa após a resposta antigênica primária e aumenta após o amadurecimento do sistema imunológico<sup>26,27</sup>.

Valores elevados de avidéz de IgG indicam infecção ocorrida em período superior de 12-16 semanas. Dessa forma, a principal utilidade do teste de avidéz de IgG verifica-se durante o primeiro trimestre de gestação, nas gestantes com sorologia IgM reagente para toxoplasmose, nas quais valores elevados de avidéz podem indicar que a infecção primária ocorreu antes da gestação, existindo risco reduzido para o feto, não havendo, dessa maneira, a necessidade de tratamento<sup>8</sup>.

Os valores de referência para determinação de baixa ou alta avidéz de IgG anti-*T. gondii* variam conforme o método utilizado. O teste de avidéz clássico é realizado por reações imunoenzimáticas, como o teste de ELISA<sup>18</sup>.

A idade gestacional desejável para a realização do teste de IgM para toxoplasmose é de 8 a 12 semanas, logo após o exame confirmatório de gravidez. Quando identificada IgM positiva para toxoplasmose, o ideal é que o teste de avidéz seja realizado na mesma amostra, já que a demora na realização desse teste faz com que não seja possível afastar com certeza a possibilidade da toxoplasmose ter sido adquirida durante a gestação<sup>28</sup>.

### Conduta para gestantes com IgM reagente

Em gestantes com primo-infecção, o tratamento precoce é essencial no sentido de reduzir o risco de

transmissão para o feto ou de diminuir as sequelas, quando o mesmo já foi acometido pelo agente<sup>10</sup>. Conhecer a fase em que se encontra a infecção pelo *T. gondii* é relevante para a instituição do tratamento adequado e, nesse sentido, o teste de avidéz de IgG assume papel significativo.

A última atualização da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo sobre conduta para gestantes está no Manual Técnico do Pré-Natal e Puerpério, de 2010<sup>29</sup>. Nesse manual, recomenda-se que seja realizado a triagem para toxoplasmose por meio da detecção de anticorpos das classes IgG e IgM (Elisa ou imunofluorescência). Em caso de IgM positiva, deve ser solicitado o teste de avidéz de IgG para detectar infecção recente no início da gestação e maior risco de transmissão congênita de toxoplasmose. Se for confirmada a infecção aguda, é indicado uso de espiramicina via oral e encaminhamento para pesquisa de infecção fetal por PCR em serviço de referência, para decisão posterior de mudança de terapia<sup>29</sup>.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura atual mostra que o teste de avidéz de IgG específica para *T. gondii* constitui uma importante ferramenta diagnóstica para toxoplasmose durante o pré-natal, identificando os casos de infecção aguda e que realmente precisam de tratamento<sup>8</sup>. Esse teste vem sendo disponibilizado em alguns serviços de saúde pública, incluído no protocolo da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo<sup>8,29,30</sup>. Porém, ainda existe a necessidade de implantação em nível nacional de um programa eficiente de controle de toxoplasmose congênita. Em 2008, foi realizado o Primeiro Simpósio Nacional de Toxoplasmose<sup>31</sup>, que reuniu profissionais que se dedicam ao estudo da toxoplasmose, os quais propuseram a inclusão de um protocolo nacional de atendimento às gestantes com toxoplasmose aguda na pauta de órgãos oficiais, como o Ministério da Saúde. O planejamento em saúde e a tomada de decisões depende da qualidade da informação científica disponível, como preconiza a Medicina Baseada em Evidências. Nesse sentido, ainda há escassez de estudos para questões levantadas por alguns autores sobre a utilização do teste de avidéz de IgG como indicador de conduta em gestantes com sorologia positiva para IgM.

Isabel e colaboradores<sup>32</sup> referem-se a casos em que a avaliação da avidéz de IgG anti-*T. gondii* foi

negativa por um método e positivo em outro método, fato que suscita a necessidade de uma padronização de métodos utilizados e da interpretação dos resultados obtidos. Outra questão a ser considerada refere-se aos custos da implantação do teste de avidéz de IgG nos serviços públicos de saúde, o que nos leva a pensar na relação custo-benefício. Estudo realizado por Margonato e colaboradores<sup>7</sup> demonstrou que, com a implantação do teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii*, há um aumento nos gastos com exames laboratoriais, entretanto, há redução dos gastos totais oriundos da utilização desnecessária de medicamentos. Outro estudo demonstrou que a utilização de dois exames (IgM e avidéz de IgG) juntamente à análise da idade gestacional tem resultados benéficos para determinar o risco de transmissão vertical durante toda a gestação, sendo um modelo de tomada de decisões pouco oneroso e que evita investigação e tratamento desnecessários em alguns casos<sup>8</sup>. Eliana Amaral<sup>30</sup> cita alguns aspectos importantes na implementação de um programa de triagem para realização da avidéz de IgG, o que descartaria a amniocentese para PCR e o uso de espiramicina em 60 % dos casos de IgM reagente.

A maioria dos estudos conclui que o teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii* é importante para o diagnóstico da toxoplasmose aguda, com implicações diretas na melhor conduta para pacientes com IgM reagente. Porém, quando extrapolamos as questões supracitadas para um país de dimensões continentais como o Brasil, percebemos que a utilização do teste de avidéz de IgG anti-*T. gondii* na triagem neonatal ainda necessita de um esforço conjunto para ser uma estratégia eficiente de controle da toxoplasmose gestacional e congênita.

## REFERÊNCIAS

1. Dubey JP. The History of *Toxoplasma gondii*: The first 100 years. *J Eukaryot-Microbiol*. 2008;55(6):467-75.
2. Frenckel JK. Toxoplasmose. In: Veronesi R, editor. Tratado de infectologia. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 1310-25.
3. Alves JAAB, Oliveira LAR, Oliveira MFB, Araujo RM, Santos RCS, Abud ACE, et al. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres grávidas. *Rev Enferm UERJ*. 2009;7(1):107-10.
4. Mandai ON, Lopes FMR, Mitsuka-Breganó R. Prevalência de anticorpos igG e igM anti-*Toxoplasma gondii* em gestantes atendidas nas unidades básicas de saúde do município de Londrina – Paraná, no período de 2003 e 2004. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39(4):247-9.
5. Stela JH. Rastreamento pré-natal para toxoplasmose na rede básica de saúde em Campinas – prevalência dos diferentes perfis sorológicos e comparação da rotina vigente com uma nova proposta [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
6. Bittencourt LHFB, Mori FMRL, Breganó RM, Zabott MV, Freire RL, Pinto SB, et al. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gestantes a partir da implantação do Programa de Vigilância da Toxoplasmose Adquirida e Congênita em municípios da região oeste do Paraná. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(2):63-8.
7. Margonato FB, Silva AMR, Soares DA, Amaral DA, Petris AJ. Toxoplasmose na gestação: diagnóstico, tratamento e importância de protocolo clínico. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2007;7(4):381-6.
8. Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FR, Souza Junior VG, Botelho CA, Figueiredo MS, et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(8):442-9.
9. Jones JL, Krueger A, Schulkin J, Schantz PM. Toxoplasmosis prevention and testing in pregnancy, survey of obstetrician-gynaecologists. *Zoon Public Health*. 2010;57(1):27-33.
10. Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2008. p. 159-78.
11. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Parasitologia Médica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 150-9.
12. Reis MM, Tessaro MM, d'Azevedo PA. Perfil Sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(3):158-64.
13. Uchôa CMA, Duarte R, Laurentino-Silva V. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev Soc Bras de Med Trop*. 1999;32(6):661-9.
14. Kodym P, Machala L, Roháčová H, Sirocká B, Malý M. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(1):40-7.
15. Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, et al. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *Clin Microbiol*. 2005;43(4):1570-4.
16. Perry LC, Tessaro MM, Guedes CR, Reis MM. Análise dos resultados da sorologia para toxoplasmose em gestantes, utilizando a pesquisa de anticorpos específicos. *Enzima Linked Fluorescent Assay*. News Lab. 2000;114-20.
17. Araújo PR, Ferreira AW. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):142-7.
18. Macre MS. Avaliação da quantificação da avidéz dos anticorpos maternos na abordagem laboratorial da toxoplasmose congênita [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2002.
19. Souza-Júnior VG, Figueiró-Filho EA, Borges DC, Oliveira VM, Coelho LR. Toxoplasmose e gestação: resultados perinatais e associação do teste de avidéz de IgG com infecção congênita em gestantes com IgM anti-*Toxoplasma gondii*. *Sci Med*. 2010;20(1):45-50.

20. Yamada H, Nishikawa A, Yamamoto T, Mizue Y, Yamada T, Morizane M, et al. Prospective study of congenital toxoplasmosis screening with use of IgG avidity and multiplex nested PCR methods. *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2552-6.
21. Canales RM, Navia GF, Torres HM, Concha M, Guzmán AM, Pérez C, et al. Evaluation of an IgG avidity commercial test: contribution to diagnosis of primary infection caused by *Toxoplasma gondii*. *Rev Chilena Infectol*. 2010;27(6):499-504.
22. Iqbal J, Khalid N. Detection of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. *J Med Microbiol*. 2007;56(11):1495-9.
23. Candolfi E, Pastor R, Huber R, Filisetti D, Villard O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(1):83-8.
24. Tanyuksel M, Guney C, Araz E, Saracli MA, Doganci L. Performance of the immunoglobulin G avidity and enzyme immunoassay IgG/IgM screening tests for differentiation of the clinical spectrum of toxoplasmosis. *J Microbiol*. 2004;42(3):211-5.
25. Deshpande PS, Kotresha D, Noordin R, Yunus MH, Saadatnia G, Golkar M, et al. IgG Avidity Western Blot Using *Toxoplasma Gondii* Rgra-7 Cloned From Nucleotides 39-711 For Serodiagnosis Of Acute Toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55(2):79-83.
26. Camargo ME, Silva SM, Leser PG, Granato CH. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991;33:213-8.
27. Joynson DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol*. 1990;43:1032-3.
28. Spalding SM, Amendoeira MRM, Ribeiro LC. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:483-91.
29. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Coordenadoria de Planejamento em Saúde. Assessoria Técnica em Saúde da Mulher. Atenção à gestante e à puérpera no SUS – SP: manual técnico do pré-natal e puerpério/organizado por Karina Calife, Tania Lago, Carmen Lavras – São Paulo: SES/SP, 2010. 234 p.
30. Amaral E. Um programa de triagem populacional para toxoplasmose? *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(8):439-41.
31. Rede Brasileira de Toxoplasmose. Carta de Búzios: proposta para controle da toxoplasmose no Brasil. *Sci Med*. 2010;20(1):5-8.
32. Isabel TF, Costa PI, Simões MJS. Toxoplasmose em gestantes de Araraquara/SP: análise da utilização do teste de avidéz de IgG anti-*Toxoplasma* na rotina do pré-natal. *Sci Med*. 2007;17(2):57-61.

## Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência

### Evaluation of cryoprotectants in the production of reference material for coliforms counting in milk powder to be used for proficiency testing

RIALA6/1552

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO<sup>1\*</sup>, Carla de Oliveira ROSAS<sup>1</sup>, Silvia Maria Lopes BRICIO<sup>1</sup>, Juliana de Castro Beltrão da COSTA<sup>1</sup>, Valéria de Mello MEDEIROS<sup>1</sup>, Márcia Barbosa WARNKEN<sup>1</sup>, Marcus Henrique Campino de La CRUZ<sup>2</sup>, Armi Wanderley NOBREGA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel.: (21) 3865-5161. E-mail: marcelollb\_8@hotmail.com

<sup>2</sup> Comissão do Programa de Ensaio de Proficiência de Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ

Recebido: 05.03.2013 – Aceito para publicação: 16.06.2013

#### RESUMO

O desafio na produção de materiais de referência (MR) destinados a ensaios microbiológicos é a instabilidade natural dos micro-organismos. A liofilização é indicada para criopreservação de culturas bacterianas quando o número de células deve ser resguardado. Agentes protetores podem ser adicionados antes do congelamento para aumentar a estabilidade do material. Neste trabalho foram avaliados os crioprotetores na produção de MR liofilizados a serem utilizados em ensaio de proficiência para contagem de coliformes. Foram produzidos quatro lotes utilizando-se diferentes crioprotetores: solução de leite desnatado a 10 % (EC1), a mesma solução contendo glicerol (EC2), sacarose (EC3) e trealose (EC4). Uma cepa de *Escherichia coli* foi empregada no preparo dos materiais. A homogeneidade foi avaliada conforme o Protocolo Internacional Harmonizado. A estabilidade foi estudada durante quatro meses à  $\leq -70$  °C (longa duração) e às temperaturas de  $-20$  °C,  $4$  °C,  $25$  °C e  $35$  °C durante cinco dias (curta duração), segundo a ISO/GUIDE 35. Apenas EC1 foi considerado não homogêneo. Os lotes permaneceram estáveis à  $\leq -70$  °C durante quatro meses. EC2 apresentou resultados insatisfatórios na estabilidade de curta duração. EC3 e EC4 foram homogêneos e estáveis nas temperaturas estudadas. A sacarose e a trealose foram consideradas crioprotetores adequados para o preparo do MR em questão.

**Palavras-chave.** material de referência, leite, crioprotetores, coliformes, ensaio de proficiência.

#### ABSTRACT

The challenge in producing reference materials (RM) for microbiological assays is the natural instability of microorganisms. Freeze-drying is suitable for bacterial cultures cryopreservation when the number of cells has to be retained. Protective agents can be added before freezing to increase the material stability. This study aimed at evaluating the use of different cryoprotectants during the production of RM, by freeze-drying, to be used in proficiency testing for coliforms enumeration. Four batches were produced adding different cryoprotectants: 10 % skim milk solution (EC1), the same solution containing glycerol (EC2), sucrose (EC3), and trehalose (EC4). A strain of *Escherichia coli* was used for preparing the materials. Homogeneity was assessed according to the International Harmonized Protocol. Stability was analyzed during four months at  $\leq -70$  °C (long-term stability) and during five days at  $-20$  °C,  $4$  °C,  $25$  °C and  $35$  °C (short-term stability), in accordance with the ISO guide 35. EC1 only was regarded as non-homogeneous. All of the lots remained stable at  $\leq -70$  °C during the four-month study. EC2 showed unsatisfactory results in the short-term study. EC3 and EC4 were homogeneous and stable at the studied temperatures. Sucrose and trehalose were regarded as suitable cryoprotectants to prepare these specific MR.

**Keywords.** reference material, milk, cryoprotectants, coliforms, proficiency testing.

## INTRODUÇÃO

A confiabilidade dos resultados das análises realizadas por laboratórios de ensaio é cada vez mais exigida por seus clientes<sup>1</sup>. Uma das formas de demonstrar a qualidade dos resultados laboratoriais é a participação em ensaios de proficiência (EP), que avalia a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio de modo competente<sup>2</sup>.

Os materiais de referência (MR) destinados a EP devem ser suficientemente homogêneos e estáveis, garantindo aos participantes o recebimento de itens de ensaio em concentrações aproximadas<sup>3</sup>. A produção de MR destinados a ensaios microbiológicos é dificultada pela instabilidade dos micro-organismos frente às variações ambientais durante as etapas de produção e de transporte<sup>4</sup>.

A matriz mais estudada na produção de MR destinados a ensaios microbiológicos em alimentos é o leite, por causa de suas propriedades crioprotetoras intrínsecas<sup>5,6</sup>. Um dos processos mais comumente utilizados na preservação de bactérias em leite é a liofilização<sup>7,8</sup>. A principal vantagem desse processo é permitir a estocagem dos líofilos por longos períodos, com menor risco de contaminação e sem demandar manipulação adicional<sup>9</sup>. Além disso, o material liofilizado pode ser mantido sob atmosfera de vácuo, diminuindo o metabolismo celular e as reações enzimáticas<sup>8</sup>.

Mesmo existindo alguns micro-organismos que possam ser liofilizados sem significativas perdas de viabilidade, esse método causa danos às células microbianas, podendo alterar a taxa de sobrevivência de determinados micro-organismos após a sua reidratação<sup>8</sup>. Como forma de contornar esses problemas, particular atenção tem sido dada ao estudo de crioprotetores, como carboidratos, proteínas e polímeros, com vistas a aumentar a resistência das células bacterianas dessecadas. Esses agentes protetores podem ser adicionados durante o crescimento celular ou antes dos processos de congelamento e liofilização, sendo a utilização diferenciada para os distintos grupos de micro-organismos<sup>7,8</sup>.

Os micro-organismos que são naturalmente capazes de sobreviver à desidratação acumulam açúcares intracelularmente, principalmente dissacarídeos como a trealose e a sacarose<sup>10</sup>. Essas moléculas de açúcares podem substituir moléculas de água intracelulares que hidratam proteínas e membranas, prevenindo a desnaturação de proteínas e a transição da fase liotrópica dos lipídeos das membranas<sup>10,11</sup>. Determinadas propriedades dos

açúcares, como osmolaridade ou viscosidade, assim como as interações entre os componentes da matriz e da célula, podem influenciar as células antes e durante a liofilização e na subsequente reidratação<sup>12</sup>. Leslie et al<sup>11</sup> observaram em seus estudos que a adição de trealose e sacarose extracelular aumentaram a estabilidade das membranas de células liofilizadas de *Escherichia coli*. Wessman et al<sup>12</sup> relataram uma melhora da viabilidade de bactérias Gram-negativas quando liofilizadas em solução de sacarose a 10 % (p/v).

As variações da resistência microbiana à dessecação também estão relacionadas à fase de crescimento na qual o micro-organismo se encontra. Devido à escassez de fontes de carbono e à exaustão de nutrientes na fase estacionária, diversas respostas fisiológicas são induzidas, fazendo com que a célula bacteriana tente resistir a essa insuficiência de nutrientes. Tais respostas de sobrevivência acabam também protegendo a célula de outras condições adversas, como a dessecação e as baixas temperaturas<sup>8</sup>. Logo, o sucesso na preservação dos micro-organismos na matriz irá depender da formulação da solução na qual a cultura será mantida antes dos procedimentos de contaminação da matriz, da fase de crescimento do micro-organismo no momento do congelamento, das condições de liofilização e da tolerância intrínseca do micro-organismo ao processo de desidratação<sup>7</sup>.

O desenvolvimento de métodos de produção de MR para a provisão de EP em microbiologia de alimentos é de grande relevância. A oferta de tais serviços com qualidade reconhecida pode contribuir no aprimoramento da qualidade analítica de laboratórios que atuam na área de microbiologia de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do leite como matriz e também do leite com três diferentes crioprotetores adicionados separadamente (glicerol, sacarose e trealose) na produção de MR contendo *E. coli*. Os resultados obtidos subsidiarão a elaboração de um protocolo para a produção de um lote de MR a ser destinado ao ensaio de enumeração de coliformes a 45 °C. A contagem de bactérias do grupo dos coliformes a 45 °C consiste em um dos critérios descritos na legislação vigente<sup>13</sup> para o controle da qualidade higiênico-sanitária de leite e outros alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa bacteriana

Uma cepa de *E. coli* tipo I isolada a partir de uma amostra de alface *in natura* no Setor de Alimentos

do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz foi utilizada para contaminação da matriz. A cepa foi caracterizada fenotipicamente pelo Sistema semi-automatizado VITEK 2.0 V. 04.02 (bioMerieux), pelo sistema miniaturizado API 20E (bioMerieux) e pelo método clássico do IMViC (I = produção de indol, M = reação de vermelho de metila, V = reação de Voges-Proskauer, C = utilização de citrato)<sup>14</sup>.

### Preparo do material

Foram produzidos quatro lotes de MR (EC1 a EC4) tendo como matrizes as respectivas soluções: EC1 – solução de leite desnatado a 10 % (Skim Milk, Difco, EUA); EC2 – solução de leite desnatado a 10 % contendo 10 % (p/v) de glicerol (1,2,3-propanotriol) (Merck, Alemanha); EC3 – solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) (Merck, Alemanha); EC4 – solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de trealose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Merck, Alemanha). O preparo dos MR teve como base o estudo descrito por Rosas et al<sup>5</sup>. A cepa de *E. coli* foi cultivada em caldo LB (Difco, EUA) contendo 10 % de cloreto de sódio, com incubação a 35 ± 2 °C. Após 28 horas, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em solução de trealose a 100 mM (Merck, Alemanha) e a concentração de células ajustada em fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, Inglaterra) a uma transmitância de 2 %. A suspensão foi mantida a 4 °C por 30 minutos, sendo posteriormente diluída até uma concentração de aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup>/mL e utilizada para o preparo dos quatro diferentes lotes produzidos. Dois mililitros da suspensão obtida foram acrescentados a 198 mL de cada uma das soluções utilizadas como matriz. Volumes de 1 mL de cada suspensão foram distribuídos em frascos estéreis com capacidade de 4 mL (Schott, Brasil). Rolhas próprias para liofilização foram posicionadas nos frascos. Posteriormente os frascos foram transferidos para um ultrafreezer à temperatura aproximada de ≤ -70 °C (Thermo, EUA) e submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas à temperatura inferior a -40 °C (K105, Liotop, Brasil).

### Inspeção visual

Logo após a retirada dos frascos do liofilizador, foi realizada uma inspeção visual com o objetivo de avaliar o aspecto das amostras liofilizadas (liquefação, caramelização ou sinais de colapso estrutural das amostras).

### Verificação de vácuo

Foi realizada a verificação do vácuo em todos os frascos de cada lote produzido, utilizando aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil), com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de liofilização. Os frascos que não apresentaram vácuo foram descartados e os demais foram lacrados com tampa metálica, identificados e estocados em ultrafreezer à temperatura de ≤ -70 °C.

### Análises microbiológicas

A quantificação do número de células presentes no material liofilizado foi realizada segundo a técnica descrita por Schulten et al<sup>15</sup>. Os líofilos foram reconstituídos com 1 mL de solução salina peptonada 0,1 % (Merck, Alemanha) e mantidos em repouso por 15 min. Foram preparadas diluições decimais e estas semeadas, em duplicata, em ágar Padrão para Contagem (Merck, Alemanha). As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 4 horas. Em seguida, foi acrescentada uma sobrecamada de 10 mL de ágar Glicose Bile Vermelho Violeta (Merck, Alemanha) em dupla concentração nas placas, sendo novamente incubadas até perfazer um total de 48 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias características presentes nas placas que se apresentaram dentro do limite de precisão da técnica (15 a 150 colônias). Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL, conforme o cálculo:  $C = x \cdot f$  (onde: C = concentração de células em UFC/mL; x = média das contagens das colônias características; f = inverso do fator de diluição).

### Estudo de homogeneidade

Dez frascos de cada lote produzido foram selecionados aleatoriamente e quantificados conforme a técnica descrita previamente. Os resultados das contagens foram convertidos em log<sub>10</sub> e submetidos à análise estatística descrita no protocolo harmonizado para avaliação da homogeneidade de cada lote. O valor de desvio-padrão alvo ( $\sigma_p$ ) atribuído foi de 0,25 log<sub>10</sub> da concentração celular, conforme adotado em outros estudos de produção de MR utilizados em EP<sup>5,6</sup>.

### Estudo de estabilidade em longa duração

A estabilidade dos lotes na temperatura de referência (≤ -70 °C) foi avaliada por um período de quatro meses a partir da data de preparo do lote. Foram realizadas análises mensais até o 4º mês, a partir da

quantificação de seis frascos de cada lote selecionados aleatoriamente. A média das contagens obtida no estudo de homogeneidade foi considerada como ponto “zero” da concentração do lote. A análise estatística dos resultados foi realizada por regressão linear e avaliada segundo os critérios descritos na ISO/GUIDE 35<sup>16</sup>.

### Estudo de estabilidade em curta duração

Foi realizado um estudo da estabilidade para transporte dos MR durante cinco dias nas temperaturas de -20 °C, 4 °C, 25 °C e 35 °C utilizando-se o modelo isócrono<sup>17</sup>. A cada dia, dois frascos de cada lote, selecionados aleatoriamente, foram acondicionados em embalagens próprias para transporte de material biológico (Concepta, Brasil) e incubados em cada uma das referidas temperaturas. No quinto dia, foi realizada a quantificação de todos os frascos incubados e de dois frascos estocados a  $\leq -70$  °C (dia “zero”), conforme descrito anteriormente. A análise estatística dos resultados ocorreu por regressão linear, segundo a ISO/GUIDE 35<sup>16</sup>.

### RESULTADOS

Na inspeção visual dos frascos, foi verificado que o material liofilizado dos lotes EC1, 3 e 4 apresentaram coloração branca com ausência de brilho, e nenhum frasco dos lotes apresentou liquefação, caramelização ou sinais de colapso estrutural. Todos os frascos do lote EC2 apresentaram aspecto não uniforme com presença de bolhas no material. Os quatro lotes produzidos apresentaram 100 % dos frascos com presença de vácuo após a liofilização.

No estudo de homogeneidade, nenhum dos lotes apresentou valores de contagem considerados aberrantes (*outliers*) segundo o teste de Cochran. O lote EC1 foi o único considerado insuficientemente homogêneo segundo os critérios estabelecidos pelo protocolo harmonizado<sup>3</sup>. Os lotes EC1, 2, 3 e 4 apresentaram média de contagem de: 3,14; 3,10; 3,26 e 2,85, respectivamente.

De acordo com a avaliação estatística preconizada na ISO/GUIDE 35<sup>16</sup>, os lotes EC1, EC3 e EC4 foram considerados suficientemente estáveis em todas as temperaturas estudadas (Tabela 1). O lote EC2 não se apresentou suficientemente estável em nenhuma temperatura avaliada no estudo de estabilidade de curta duração (Tabela 1). Os resultados das médias das contagens dos frascos do estudo de estabilidade em curta duração estão apresentados na Tabela 2.

### DISCUSSÃO

A utilização de aditivos crioprotetores tem sido uma estratégia para contornar o problema da instabilidade dos micro-organismos frente ao processo de liofilização<sup>12</sup>. Esses aditivos são geralmente avaliados com objetivo de aumentar a viabilidade celular após o congelamento e a liofilização, e não para analisar a estabilização da concentração microbiana ao longo do tempo de estoque dos micro-organismos liofilizados. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar diferentes aditivos crioprotetores (glicerol, sacarose e trealose) na produção de MR destinados a ensaios microbiológicos em alimentos. Neste estudo, a liofilização se mostrou adequada para preservação do material referentes aos lotes EC1, 3 e 4, uma vez que todos os frascos do lote apresentaram vácuo e aparência satisfatória após a dessecação. Essa técnica já foi utilizada com sucesso na produção de MR contendo outros micro-organismos nas matrizes leite<sup>5,6</sup>, queijo<sup>18</sup> e carne bovina<sup>19</sup>.

A cepa de *E. coli* tipo I foi selecionada uma vez que representa a espécie mais comumente isolada dentro do grupo dos coliformes termotolerantes<sup>14</sup>. A bactéria foi cultivada em caldo LB (meio de cultura com composição básica de nutrientes) contendo 10 % de cloreto de sódio, com o objetivo de estimular a produção de trealose dentro da célula. O acúmulo da trealose endógena promove uma proteção da estrutura terciária das proteínas, pela formação de pontes de hidrogênio, protegendo-as da desnaturação durante o processo de dessecação. O contato das células com a solução de trealose após a centrifugação da cultura bacteriana teve a finalidade de proteger a face externa da membrana citoplasmática, além de permitir que a trealose penetrasse e se acumulasse nas células por difusão passiva, aumentando, assim, ainda mais a estabilidade da membrana durante a liofilização<sup>8,20</sup>.

O glicerol tem sido o aditivo crioprotetor mais utilizado em microbiologia<sup>7</sup>. O lote produzido com glicerol (EC2) apresentou o menor valor em módulo do coeficiente angular no estudo de estabilidade em longa duração (Tabela 1). Tal resultado aponta o glicerol como o crioprotetor mais eficaz entre os avaliados, na manutenção da concentração celular a  $\leq -70$  °C, uma vez que apresentou a menor taxa de declínio da concentração celular ao longo do tempo, em relação aos demais lotes. No entanto, o lote não se apresentou suficientemente homogêneo e as unidades do lote apresentaram aspecto

**Tabela 1.** Análise de regressão do estudo de estabilidade e avaliação de acordo com a ISO/GUIDE 35

Lote	Temperatura (°C)	Coefficiente Angular	Limite Inferior (95 %)	Limite Superior (95 %)	Avaliação
EC1 <sup>a</sup>	≤ -70 °C	-0,134	-0,308	0,040	Estável
	-20	-0,081	-0,260	0,097	Estável
	4	-0,070	-0,404	0,263	Estável
	25	-0,141	-0,291	0,010	Estável
	35	-0,088	-0,267	0,090	Estável
EC2 <sup>b</sup>	≤ -70 °C	-0,070	-0,233	0,094	Estável
	-20	-0,130	-0,200	-0,061	Não estável
	4	-0,148	-0,257	-0,039	Não estável
	25	-0,694	-1,082	-0,305	Não estável
	35	-0,670	-1,266	-0,073	Não estável
EC3 <sup>c</sup>	≤ -70 °C	-0,147	-0,329	0,035	Estável
	-20	-0,010	-0,064	0,045	Estável
	4	-0,012	-0,154	0,129	Estável
	25	0,010	-0,056	0,076	Estável
	35	-0,049	-0,149	0,050	Estável
EC4 <sup>d</sup>	≤ -70 °C	-0,126	-0,307	0,054	Estável
	-20	-0,172	-0,366	0,022	Estável
	4	-0,065	-0,282	0,152	Estável
	25	0,019	-0,091	0,129	Estável
	35	-0,280	-0,594	0,035	Estável

<sup>a</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 %; <sup>b</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 % contendo 10 % (p/v) de glicerol; <sup>c</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de sacarose; <sup>d</sup> solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de trealose

não uniforme após a liofilização. Além disso, os resultados da estabilidade no estudo de curta duração não foram satisfatórios, até mesmo a -20 °C (Tabela 1). Na análise dos frascos referentes ao quarto dia de estoque a 25 °C e no segundo dia de estoque a 35 °C não foi observado crescimento microbiano (Tabela 2). Esses resultados demonstram que a exposição do material a temperaturas mais elevadas em um curto período de tempo (cinco dias) já comprometeu a concentração celular do lote.

Estudos demonstraram que a sacarose e a trealose aumentam a tolerância à dessecação em diferentes micro-organismos devido à estabilização de membranas e proteínas<sup>8</sup>. A sacarose, em concentrações de 1 a 68 % (mediana de 10 %), tem sido frequentemente utilizada para criopreservação de micro-organismos<sup>7</sup>. A sacarose a 100 mM, equivalente a 3,4 % (p/v), foi utilizada neste estudo na produção do lote EC3. Esse lote apresentou a maior concentração de células após a liofilização, com média de 3,26 log<sub>10</sub> UFC/mL. Esse resultado aponta que a sacarose proporcionou maior resistência às bactérias ao processo de liofilização e a reconstituição do líofílico. O lote apresentou os menores valores em módulo do coeficiente angular em

todas as temperaturas avaliadas no estudo de estabilidade em curta duração (Tabela 1). Logo, a sacarose propiciou uma maior resistência às células bacterianas também na exposição a temperaturas de até 35 °C no período de cinco dias. Esses resultados foram similares aos obtidos em um estudo de produção de MR contendo um *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* e outro *Listeria innocua*, produzido na mesma matriz (leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de sacarose), que também foi considerado suficientemente homogêneo e estável<sup>6</sup>.

O número de células obtido no lote EC4 (2,85 log<sub>10</sub> UFC/mL) foi inferior ao do lote EC1 (3,14 log<sub>10</sub> UFC/mL), apresentando perda de 9,2 % da concentração de células. Esse resultado indica que o uso da trealose a 100 mM, equivalente a 3,78 % (p/v), pode ter induzido a morte celular durante o congelamento/liofilização ou no momento da reconstituição dos líofilos. Contudo, essa redução na concentração não comprometeu a homogeneidade e a estabilidade do lote, que foram consideradas satisfatórias. O produtor que optar por utilizar esse crioprotetor deve ficar atento a essa redução na concentração no momento do planejamento da produção do seu material.

**Tabela 2.** Resultados das médias das contagens dos frascos ( $\log_{10}$  UFC/mL) do estudo de estabilidade em curta duração dos lotes EC1-4 nas temperaturas de -20 °C, 4 °C, 25 °C e 35 °C ao longo de cinco dias

Tempo(dias)	EC1 <sup>a</sup>				EC2 <sup>b</sup>				EC3 <sup>c</sup>				EC4 <sup>d</sup>			
	-20 °C	4 °C	25 °C	35 °C	-20 °C	4 °C	25 °C	35 °C	-20 °C	4 °C	25 °C	35 °C	-20 °C	4 °C	25 °C	35 °C
0	3,03	3,03	3,03	3,03	3,44	3,44	3,44	3,44	3,15	3,15	3,15	3,15	2,51	2,51	2,51	2,51
1	3,12	2,83	2,70	2,76	3,03	2,88	2,38	2,09	2,98	2,84	2,96	3,34	2,89	3,11	2,62	2,39
2	2,64	2,51	2,96	2,26	2,98	2,81	2,20	0	2,93	3,12	3,22	3,10	2,73	2,20	2,37	2,69
3	2,50	1,95	2,32	2,76	2,89	2,84	2,24	0	2,99	3,22	3,14	3,19	2,08	2,43	2,29	2,42
4	2,43	2,13	2,66	2,72	2,81	2,60	0	0	3,06	3,23	3,19	- <sup>e</sup>	2,32	2,30	2,62	1,99
5	2,89	3,06	2,20	2,33	2,68	2,56	0	0	3,02	2,80	3,10	2,96	1,78	2,49	2,66	0,85

<sup>a</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 %; <sup>b</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 % contendo 10 % (p/v) de glicerol; <sup>c</sup> matriz composta por solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de sacarose; <sup>d</sup> solução de leite desnatado a 10 % contendo 100 mM de trealose; <sup>e</sup> Erro de análise (resultado não considerado na regressão linear)

## CONCLUSÃO

Considerando que os MR produzidos devem seguir requisitos de homogeneidade e estabilidade, o lote produzido sem adição de crioprotetor (EC1) e o lote produzido com glicerol (EC2) não foram adequados ao uso pretendido devido à falta de características de homogeneidade e de estabilidade, respectivamente. Os lotes produzidos com sacarose (EC3) e trealose (EC4) apresentaram todos os requisitos necessários de um MR de qualidade e poderiam ser utilizados em um EP. Esses MR poderão ser transportados à temperatura ambiente para os laboratórios participantes de um EP, respeitando-se um prazo máximo de recebimento dos analitos de cinco dias e temperatura limite de transporte de 35 °C, tendo em vista que temperaturas mais elevadas não foram estudadas.

## AGRADECIMENTOS

À Finep, pelo apoio financeiro no projeto *Apoio à Capacitação para Produção de Materiais de Referência Certificados (MRC) e Provisão de Ensaio de Proficiência (EP) - EP - MRC - 01* e concessão de bolsa a Juliana de Castro Beltrão da Costa.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro (RJ), 2005. 31 p.
2. Roberts D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Arch Hig Rada Toksikol J*. 1999;50(1):55-65.
3. 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.
4. Philipp WJ, Iwaarden PV, Schimmel H, Meeus N, Kollmorgen N. Development of reference materials for microbiological analysis. *Accred Qual Assuranc*. 2007;12(3-4):134-8.
5. 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.
6. Brandão 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. *Rev Analytica*. 2013;63(Fevereiro/Março):60-71.
7. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol*. 2003;46(3):205-29.
8. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. *J Microbiol Meth*. 2006;66(2):183-93.
9. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 2004;14(10):835-47.
10. Oliver AE, Hincha DK, Crowe JH. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. *Comp Biochem Physiol Part A*. 2002;131(3):515-25.
11. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(10):3592-7.
12. Wessman P, Mahlin D, Akhtar S, Rubino S, Leifer K, Kessler V, et al. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *J Sci Food Agric*. 2011;91(14):2518-28.
13. 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, nº7-E. p. 45-53.
14. Jay JM. Indicadores Microbiológicos de Qualidade e Segurança dos Alimentos. In: Jay JM, editor. *Microbiologia de alimentos* Sexta Edição. Porto Alegre: Artemd, 2005. p. 413-31.
15. 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. 74p. ISBN 92-828-991-8. [acesso 29 Nov 2012]. Disponível em: [<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/4261>].
16. International Organization for Standardization – ISO. ISO/GUIDE 35 – Reference materials – General and statistical principles for certification. Geneva; 2006.
  17. Lamberty 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.
  18. Brandão 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.
  19. Vieira LR, Rosas CO, Brandão 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. XVII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos; Cuiabá – Mato Grosso: Anais do 17º ENAAL e 3º Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos 2011.
  20. Welsh DT, Herbert RA. Osmotically Induced Intracellular Trehalose, but not Glycine Betaine Accumulation Promotes Desiccation Tolerance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Letters*. 1999;174:57-63.

# Characterization of lactic acid bacteria in coalho cheese and antagonism to some pathogenic food-related bacteria

## Caracterização de bactérias lácticas em queijo de coalho e antagonismo a alguns patógenos

RIALA6/1553

Wilma Carla de FREITAS<sup>1</sup>, Antônio Eustáquio Resende TRAVASSOS<sup>2</sup>, Janeeyre Ferreira MACIEL<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência<sup>1</sup>: Cidade Universitária, s/n, Campus Universitário I, Bairro Castelo Branco, CEP: 58059-900, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil, Tel.: (83) 32167384. E-mail: wilmacf@hotmail.com

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus III, Bananeiras, Paraíba (PB), Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia e Química de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil.

Recebido: 19.03.2013 - Aceito para publicação: 30.06.2013

### RESUMO

O queijo de coalho é um produto tradicional do nordeste brasileiro e o conhecimento da sua microbiota autóctone é de fundamental importância. Neste trabalho foi caracterizada a microbiota do queijo de coalho de três propriedades rurais (A, B e C), situadas respectivamente nas mesorregiões do Agreste, Borborema e Sertão paraibanos, com o intuito de avaliar a importância do perfil das bactérias lácticas encontradas neste tipo de queijo e verificar a atividade antimicrobiana destas bactérias frente a agentes patogênicos. As contagens de bactérias lácticas do queijo de coalho dos produtores A e B foram na ordem de  $10^6$  e as maiores contagens ( $10^9$  UFC/g) foram observadas no queijo do produtor C. Foram selecionadas 49 bactérias lácticas típicas das três propriedades e os gêneros predominantes foram: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Dos 20 isolados, 19 apresentaram halos de inibição sobre as três bactérias patogênicas, com zonas de inibição de 2 a 15 mm, e os maiores halos foram formados por *Lactococcus lactis* ssp *lactis* sobre *S. enterica* e *S. aureus*. A atividade antimicrobiana revelada por alguns isolados de bactérias lácticas sugerem a possibilidade de seu uso contra agentes patogênicos e podem atuar como barreira no desenvolvimento destes micro-organismos e como conservantes biológicos.

**Palavras-chave.** queijo, *Lactococcus*, *Staphylococcus aureus*.

### ABSTRACT

The coalho or curdled cheese is a traditional product of the Brazilian Northeast region, but the knowledge on its autochthonous microbiota is critical. This survey aimed at characterizing the microbiota of coalho cheese produced in three rural properties (A, B and C), located in Agreste, Borborema and Sertão regions of State of Paraíba - Brazil, respectively. The relevance of the profile of lactic acid bacteria found in this type of cheese was assessed, and the antimicrobial activity of these identified bacteria against *Salmonella enterica*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* was analyzed. The lactic acid bacteria counts of coalho cheese from producers A and B were  $10^6$  and the highest counts ( $10^9$  UFC/g) were found in cheese samples from producer C. Forty-nine lactic acid bacteria from three rural properties were selected and predominant genera was *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* and *Leuconostoc*. Of 20 bacteria isolated, 19 showed inhibition halos on the three pathogenic bacteria with diameter of 2 to 15 mm, and the largest halos were formed by *Lactococcus lactis* ssp *lactis* on *S. enterica* and *S. aureus*. The antimicrobial activity displayed by some lactic acid bacteria isolates suggests the possibility of its use against pathogens, and they might be effective as a barrier in these microorganisms development and as biological preservatives in coalho cheese.

**Keywords.** cheese, *Lactococcus*, *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUCTION

Cheese are important sources of nutrients and have great diversity of flavors, textures and shapes due to natural variability of milk, local of production, and processing techniques by which were produced the following basic principles the more than a thousand varieties of existing cheeses, basically involving the combination four ingredients: milk, curds, salt and micro-organisms, for its production<sup>1</sup>.

The Coalho cheese is a cheese made with crud or semi-cooked dough, produced for over a century from raw and/or pasteurized cow's milk<sup>2</sup>. It is part of alimentary habits, and source of income and employment for a portion of small and medium producers. This cheese is one of the traditional milk products produced in Northeastern Brazil and has its origin related to artisanal manufacturing, a fact that persists today<sup>3</sup>.

The handicraft cheeses present a typical and different microbial population, which is related with the region of origin of the raw material and its manufacturing technology<sup>4</sup>. In general, these milk products have a variety of bacteria, including lactic acid bacteria that produce enzymes and are used for the production and preservation of foods, having the ability to promote changes beneficial to animal and human health. These micro-organisms are essential in all varieties of natural cheese and play important roles during manufacture and maturation<sup>1</sup>.

Lactic bacteria are used for the production and preservation of foods. The fermentation of milk, besides increasing its conservation life, provides greater availability of their nutrients. Some of these micro-organisms also have the ability to alter the intestinal microbiota and promote beneficial changes to human and animal health. Thus, the acidity developed by these micro-organisms used in the manufacture of fermented dairy products aids in the absorption and utilization of nutrients by the body of the consumer, which can be used in industry as a way to provide products with increased nutritional values, and prevent possible food borne illness.

The Coalho cheese is a typically Brazilian product and yet there are few studies that can bring important scientific contributions, particularly to improve the quality of these products. This study aimed to characterize the microbiota of the Coalho cheese, produced in the region of Paraíba - PB, Brazil, in order to assess the importance of profile of the lactic acid bacteria found in this type of cheese.

## MATERIAL AND METHODS

### Count, isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria

Randomly we selected three farms that produced and traded artisanal Coalho cheeses, located in the regions of Paraíba: Agreste of Paraíba (in the City of Bananeiras), Boa Vista (micro region of the Cariri) and of the region of the Sertão (city of Patos).

Were collected from each property on the same date, samples indicative of Coalho cheese (1 kg), every fortnight, in triplicate, in the period from March to July 2009. These properties adopted systems of cheese production based on traditional techniques, without registration and without adopting good manufacturing practices, leaving the responsibility for the preparation and sale of products made to the owner. All these producers of the not used to pasteurize to the milk and did not add yeast in the production of Coalho cheese. Each processed on average 50 liters of raw milk, obtaining about five units of 1 kg of Coalho cheese per day. A piece of Coalho cheese was wrapped in plastic bags, using, in the collection of materials previously sterilized and aseptic collection procedures. The samples identified were transported in cool boxes containing ice, kept refrigerated and taken to the laboratories of Food Microbiology - CT-UFPB, Campus I-João Pessoa - PB, for the analyzes. In the laboratory, portions of 25 grams of Coalho cheese, taken alternately, were homogenized in a blender during 2 minutes at low speed. For the dilution of samples, we used 0.1 % peptone saline<sup>5</sup>.

For the count of lactic acid bacteria from curd cheese samples, were inoculated 0.1 mL of the dilutions of the samples, on surfaces, in MRS agar (1.5 % agar) (Himedia) modified by the addition of cysteine-HCl (0.05 %), calcium carbonate (5 g/litro) and bromcresol purple (0.04 g/liter). After seeding samples made by the addition of a cover layer, consisting of the own medium containing 0.75 % of agar (semisolid medium), which together with cysteine-HCl allowed incubation of lactic acid bacteria under anaerobic conditions (37 °C). The purple and calcium carbonate have been used to allow viewing of yellow halos around the colonies, indicators of acid production.

After incubation at 37 °C during 48 hours, were counted plates containing 15-150 colonies surrounded by yellow haloes, considered typical of lactic acid bacteria. Of these plates it was isolated, in medium similar to that used in counting, randomly, a number of typical

colonies equivalent to the square root of the count, using the technique of grooves on quadrant. After incubation at 37 °C for 24 hours, tests were conducted Gram and catalase. The Gram-positive and catalase negative were streaked on inclined MRS agar, incubated at 37 °C for 48 hours, and then kept in refrigeration until the testing and confirmation of identification. Purification was performed by repeating of previously isolated strains, maintained in inclined MRS agar incubated at 37 °C for 48 hours.

Initially, the isolated cultivated in MRS broth at 37 °C for 48 hours, were subjected to the following characterization tests: gram stain, catalase, gas production, growth at 45 °C temperature and increased concentration of 6.5 % of sodium chloride. These tests have been used in the presumptive identification of isolates at the genus level, according to the scheme proposed by Cogan et al<sup>6</sup>.

Subsequently, the isolated of the samples of Coalho cheese were analyzed for biochemical profile from the fermentation of 49 carbohydrates, using the API 50 CHL system (BioMérieux, Marcy-I'Étoile - France) and identified to the species level by using a database (V5.1) provided by the system itself (API software WEB TM), making it according to the manufacturer's instructions. The results of this test were compared, in terms of gender, with those obtained by the scheme proposed by Cogan et al<sup>6</sup>.

#### Detection of antimicrobial activity

The antagonistic activity of lactic acid bacteria was tested on *Salmonella enterica* (ATCC 6017), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). The pathogens were cultured in BHI (Himedia) at 36 °C during 24 hours. The deferred method was used for detection of antagonistic activity of lactic acid bacteria. The identified lactic cultures, maintained on MRS agar were grown in MRS broth, incubated at 36 °C for 16 hours. After incubation, it was read the optical density of the bacterial suspension at 530nm in a spectrophotometer. When necessary, dilutions were made of lactic culture using the culture broth as a diluent in order to standardize the inoculum to an optical density of 0.4, equivalent to the McFarland 2. Subsequently, 10 uL of the lactic culture was inoculated onto the surface of plates containing 15 mL of solid medium (1.5 % agar) MRS, three bacteria being added per plate.

The plates with MRS medium was incubated at 37 °C for 24 hours in an anaerobic jar at 37 °C for 24

hours. Simultaneously, pathogenic bacteria were grown in BHI broth at 37 °C during 24 hours. After incubation during 24 hours, the plates were covered with 5 mL of MRS semisolid agar (0.75 % agar), according to the media contained in the base plate, 300 µL added to the suspension of the pathogen grown in BHI. These plates were again incubated under aerobic conditions at 37 °C during 24 hours and examined for formation of inhibition zones. For the purpose of recording, the external diameter of inhibition halo of the colony subtracted from the diameter of colony corresponded to the zone of inhibition<sup>7</sup>. The results were analyzed using conventional descriptive statistics, with determinations of average, minimum and maximum values and their respective standard deviations.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Lactic bacteria count

In the Table 1 we see the lactic acid bacteria counts of samples of Coalho cheese; it was observed in the samples A and B properties, average values in the order of 10<sup>6</sup> CFU/g, being observed for the producer C higher counts ranging from 1.1 x 10<sup>7</sup> to 3.4 x 10<sup>9</sup> CFU/g. Possibly, the largest number of lactic acid bacteria in milk, combined with a lower contamination of the raw material (Table 1) was the factors that contributed most to the greatest number of lactic acid bacteria in cheese samples from producer C.

**Table 1.** Counts of lactic acid bacteria in Coalho cheese from producers A, B and C

Repetition	Produtor A	Produtor B	Produtor C
I	3,0x10 <sup>5</sup>	7,2x10 <sup>6</sup>	3,4x10 <sup>9</sup>
II	7,1x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>
III	1,0x10 <sup>7</sup>	5,4x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>7</sup>
Average	5,8x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>

PA- from farm A; PB- from farm B; PC- from farm C

According to Nascimento<sup>8</sup>, analyzing samples of frescal cheese from Minas Gerais, found lactic acid bacteria counts above 10<sup>5</sup> CFU/g. Ouadghiri et al<sup>9</sup>, studying the biodiversity of these bacteria in Moroccan white cheese Jben, found lactic acid bacteria counts between 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> CFU/g.

The main function of lactic acid bacteria in food of these products is acidification at pH around four, which prevents the development of undesirable bacteria (by the production of organic acids, predominantly lactic

acid). This allows that the conservation time of fermented products is much greater than the product in which the feedstock has not been fermented. Another function of lactic acid bacteria is to develop the organoleptic properties of fermented products<sup>9</sup>.

### Isolation of lactic acid bacteria

We isolated 49 colonies typical of lactic acid bacteria from the samples of Coalho cheese analyzed, which were grouped into four different genres, with different levels of occurrence between samples. Of the total of 20 isolates tested for species identification using API, 12 were possible of identification as twelve strains of *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, one of *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, one of *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*, one of *Pediococcus damnosus* and three of *Pediococcus* spp. Still, five strains were identified as *Lactobacillus* and three unidentified (Table 2). Of the six isolates that were not identified to the species level, four were identified according to the traditional method of Cogan et al<sup>6</sup> as possible *Enterococcus*, and as the API is not kit the for the identification of the kind, such isolates obtained from unacceptable profile identification (Table 2).

Some species of the genus *Enterococcus* (*E. faecium* and *E. faecalis*) are the most common in foods. This genus has the capacity to grow over a wide temperature range of 10 to 60 °C. In artisanal cheeses made from raw milk, these microorganisms can come from raw materials or the environment and can develop sensory characteristics to the cheese through biochemical reactions during cure<sup>10</sup>.

The identification of bacteria belonging to the genus *Lactococcus* was that better matched between the two methods mentioned, with the best similarity indices ranging between 55.0 % and 98.0 %. Among the species of *Lactococcus*, *L. lactis* is the most important commercially and is commonly used as a simple yeast, mixed or multiple for manufacturing different types of dairy products<sup>8</sup>. The *Lactococcus* are predominant in fresh cheese that does not undergo a baking of dough and its presence is reduced during the cure process and the species *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* spp. and subsp. *lactis* are associated with dairy products, are used as flavoring micro-organisms<sup>11</sup>. The genus *Pediococcus* produces diacetyl from glucose, thereby improving the flavor of cheeses during maturation<sup>12</sup>.

The identification of isolates using the methods of Cogan et al<sup>6</sup> and identification by API coincided by 25 %,

diverging for most identifications (75 %) performed. In general, the classification was given as “low discrimination”, demonstrating the difficulty of establishing a relationship between the two methodologies.

Although the API 50 CHL system have allowed the identification of some lactic acid bacteria at species level, with a higher power of discrimination, some lactic acid bacteria have been identified so inconclusive as to the isolates (Table 2), which were identified as the *Lactobacillus* when their morphology corresponded to form of cocci. This discrepancy may be related to the fact that bacteria of the genus *Lactobacillus* have a physiology similar to the genera *Leuconostoc* and *Pediococcus*, these genres being considered phylogenetically interrelated<sup>12</sup>.

According to Morsi el soda et al<sup>13</sup> isolating and identifying lactic acid bacteria of some Egyptians cheeses (Ras, Domiatti, Kareish Zabady and Laban), using the API system, achieved a satisfactory identification, identifying about 51 % of the isolates obtained, indicating that some commercial identification systems, can often produce good results on identification of genres, but they were not totally appropriate to the species level.

Abd El Gawad et al<sup>14</sup>, identifying lactic acid bacteria in traditional Egyptian milk, using the API 50CHL commercial system and API 20 Strep and identified 38 isolates (23 %) and 22 (13 %), respectively. The growing use of rapid identification techniques has promoted significant contributions to the knowledge of the microbiota of certain foods, including cheeses, but other factors must be taken into account as: taxonomic changes, changes in nomenclature used and additional tests such as PCR, RAPD.

### Antagonist activity

Of the twenty strains of lactic acid bacteria tested for production of antimicrobial substances, nineteen were positive for inhibition of the three strains of pathogenic bacteria tested as indicator (*S. enterica*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*), so the isolated AP16 was effective in inhibition of *S. enterica* and *L. monocytogenes* (Table 3).

The inhibition halos formed ranged between two and 15 mm, with the largest inhibition halo formed by strain PC17 (identified as suggestive of the genus *Enterococcus* according to traditional methodology) against *S. aureus*. The *Enterococcus* are producers of enterocins, with already established activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus*.

**Table 2.** Distribution of species of lactic acid bacteria isolated from samples of Coalho cheese and identified by API 50 CHL test

Isolated	Identification at genus level according Cogan et al <sup>6</sup>	Identification at species level according to the API	% Similarity Index
PA1	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	78,4 %
PA7	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	55,8 %
PA8	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	55,8 %
PA13	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i> spp.	61,7 %
PA15	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	68,4 %
PA16	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i> ssp.	14,0 %
PB5	<i>Enterococcus</i>	Unacceptable	-
PB6	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	90,0 %
PB10	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	88,0 %
PB11	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	90,0 %
PB13	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	87,3 %
PB14	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	75,5 %
PC4	<i>Streptococcus</i>	Unacceptable	-
PC7	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	94,0 %
PC10	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	55,0 %
PC11	<i>Enterococcus</i>	Unacceptable	-
PC13	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	98,0 %
PC14	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i> spp.	56,0 %
PC17	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	67,9 %
PC18	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	66,0 %

PA - producer A, PB - producer B and PC - producer C.

The largest inhibition zones (14 mm) formed by a same lactic bacterium was found for the species *L. lactis* ssp. *lactis* (PB13 and PC10) on *S. enterica* and *S. aureus*. The strain identified as *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* (PA1) showed greater activity against *S. enterica* (8mm) and *S. aureus* (7 mm). Lactic acid bacteria identified as *Pediococcus* spp. (PA13, PA16, PC7 and PC14) showed broad spectrum of antibacterial activity against bacteria *S. aureus* and *S. enterica*. Bacteria of the genus *Pediococcus* can produce bacteriocins, called pediocins such as *Pediococcus pentosaceus* (pediocin A) and *Pediococcus damnosus* (pediocin PD-1), which have an antagonistic effect on spoilage and pathogenic bacteria in foods<sup>8</sup>.

The species of the genus *Lactococcus* showed those identified most frequently in the cheese samples analyzed, and the isolated *L. lactis* ssp. *lactis* and *L. lactis* ssp. *cremoris* showed broad spectrum of activity against the bacterial strains tested as revealing. Nascimento<sup>8</sup> evaluating the antimicrobial activity of bacteriocinogenic cultures, found that strains of *L. lactis* subsp. *lactis* showed antimicrobial effect on 80 % (8/10) of the strains of *L. monocytogenes* and 40 % (2/5) of strains of *S. aureus* evaluated. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produce nisin, bacteriocin already used as preservatives in foods, has a

broad antimicrobial spectrum being active against Gram positive bacteria and spores, besides being used as a food preservative<sup>15</sup>.

*S. aureus* was found as the most sensitive microorganism to antagonistic substances produced by the lactic acid bacteria tested. Some authors report that the higher the rate of multiplication of lactic acid bacteria in growth substrate and subsequent production of lactic acid, the stronger inhibition of *S. aureus*. The rapid reduction in pH associated with the characteristics of biological competition of lactic acid bacteria are factors inhibiting the growth inhibition of *Staphylococcus* species<sup>16</sup>. It is worth noting also that the inhibitory effect established by lactic acid bacteria against strains of pathogenic and deleterious bacteria related to food also occurs due to the production of bacteriocins and other antimicrobial substances such as diacetyl and hydrogen peroxide<sup>17</sup>.

Changes in measures of inhibition zones, and consequently the sensitivity of the revealing strains tested, observed when the action of lactic acid bacteria strains of the same species or different species may also be related to the existence of different mechanisms of inhibition and/or nature inhibitory chemical substance that influences its diffusion in the culture medium<sup>18</sup>.

**Table 3.** Zones of inhibition (mm) produced by lactic acid bacteria isolated on *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in MRS

Isolated	Lactic acid bacteria Identified by API	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>
PA1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	5	7
PA7	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	4	3
PA8	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	4	6	3
PA13	<i>Pediococcus</i> spp.	8	7	11
PA15	NI	8	9	14
PA16	<i>Pediococcus damnosus</i>	3	0	7
PB5	NI	8	9	14
PB6	NI	7	9	8
PB10	NI	12	10	9
PB11	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	4	8
PB13	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	3	14
PB14	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	4	8
PC4	NI	14	6	9
PC7	<i>Pediococcus damnosus</i>	10	3	6
PC10	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	14	6	14
PC11	NI	7	8	6
PC13	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	5	5	5
PC14	<i>Pediococcus</i> spp.	5	3	5
PC17	NI	8	9	15
PC18	NI	5	9	6
Average (DP)		7,9 (2,84)	5,9 (2,68)	8,6 (3,73)

PA- producer A, PB- producer B and PC- producer C; NI – unidentified; Halo inhibition in millimeters (mm)

It is also worth mentioning that many bacteriocins are active against pathogenic micro-organisms of interest in food, so that is growing interest in the food industry about the potential use of these compounds in foods to replace chemical preservatives<sup>19</sup>.

*L. monocytogenes* is a pathogen commonly inhibited by bacteriocins produced by lactic acid bacteria. According to Alexandre<sup>20</sup>, from 48 strains isolated from cheese, 25 % were able to inhibit the *S. aureus* and *L. monocytogenes*. In contrast, other authors evaluating the microbiota of raw milk, mentioned that the bacteriocins produced by lactic acid bacteria may not have much influence on the possible pathogens, since *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* show good match with regard to micro-organisms present in the raw material<sup>21</sup>.

The lactic acid bacteria strains tested showed greater inhibition capacity of the strains of Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes* and *S. aureus*), shown by the formation of larger zones of inhibition of growth. Other studies also reported greater inhibition of strains of Gram-positive bacteria by bacteriocinogenic lactic cultures<sup>16,22,23,24</sup>. Specifically against Gram-negative bacteria, the double

lipid layer present on its outer cell structure prevents interaction of specific antagonists substances with wall and bacterial plasma membrane<sup>9</sup>. The antimicrobial activity of bacteriocins produced by lactic cultures can act as a barrier in the development of these micro-organisms, acting as biological preservatives in Coalho cheese<sup>4</sup>.

Guedes Neto et al<sup>17</sup> demonstrated functional properties, such as in vitro antagonism against undesirable microorganisms and antibiotic resistance in strains of lactic acid bacteria isolated from curd cheese produced in the state of Pernambuco (Brazil). The presence of lactic acid bacteria antagonists of endogenous micro flora as part of samples of Coalho cheese can act as an agent of controlling the population of pathogenic microorganisms in these substrates by inhibiting their multiplication in different stages of processing as well as during its storage<sup>9,19</sup>.

The results show that there are a variety of autochthonous lactic acid bacteria in Coalho cheese made by hand with the ability to produce different antimicrobial substances. The selection of these bacteria can be used as cultures in the preparation of the Coalho cheese type and may thus enhance the consumption of these products.

## CONCLUSION

From a total of twenty (20) isolates, twelve (60 %) were identified by APIKIT and identification of the isolates between the two methodologies coincided 25 % compared to the genus *Lactococcus*, diverging identifications with most (75 %) performed by methodology according Cogan et al<sup>6</sup>.

The antimicrobial activity displayed by some strains of lactic acid bacteria suggest the possibility of its use against pathogens such as: *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, and can act as a barrier in the development of microorganisms and as biological preservative in Coalho cheese.

## REFERENCES

1. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*. 2001;11:259-74.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E. p.45-53.
3. Cavalcante JFM, Andrade NJ de, Furtado MM, Ferreira CL de, Pinto CL de, Elard E. Processamento do queijo Coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Cienc Tecnol Alimen*. 2007;27(1):205-14.
4. Carvalho JDG, Viotto WH, Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological process. *J Food Control*. 2007;(1):262-7.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria Nacional de Defesa Animal. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem animal e seus Ingredientes: II. Métodos físicos e químicos. Diário Oficial [da] União, 2003. n.83, Seção 1, p.15.
6. Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-Salvadori B, Cocconcelli PS, Fernandes I, et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res*. 1997;64(3):409-21.
7. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1983;45(6):1808-15.
8. Nascimento MDAS, Moreno I, Kuaye AY. Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. *Int J Dairy Technol*. 2008;61(4):352-7.
9. Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M, Swings J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiol Letters*. 2005;251:267-71.
10. Mamede PL, Perri JM, Rosado MS, Piton A, Kuaye AY, Viotto WH. Caracterização de queijos de Coalho elaborados com culturas selecionadas de *Enterococcus*. 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos; 2007; Campinas, São Paulo.
11. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, Mcsweeney PLH. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc; 2000. 5: 54-97.
12. Holzapfel HW. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. Springer; 2006. p. 229- 66.
13. Morsi el soda N, Ahmed N, Omran N, Osram G, Morsi A. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese making. *Emir J Agric Sci*. 2003;15(2):51-71.
14. Abd el Gawad LA, Ab el Fatah AM, Al Rubayyi KA. Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from tradicional Rayeb milk in Egypt. *J Am Sci*. 2010;6(10):728-35.
15. Liu X, Chung YK, Yang ST, Yousef AE. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem*. 2004;40:13-24.
16. Savadogo A, Quattara IH, Traore AS. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. *Pakistan J Nutr*. 2004;3(3):174-9.
17. Guedes Neto LG, Souza MR, Nunes AC. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo de Coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(2):245- 50.
18. Maciel JF, Teixeira MA, Moraes CA, Gomide LAM. Antibacterial activity of lactic cultures isolated of italian salami. *Braz J Microbiol*. 2003;34(1):121-2.
19. Nero LA, Mattos MR, Barros MAF, Beloti V, Franco BDGM. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiol Res*. 2009;164:529-35.
20. Alexandre DP, Silva MR, Souza MR, Santos WLM. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro-organismos indicadores. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2002;4(4):424-8.
21. Issa MS, Ryser ET. Fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* DT104, and *Escherichia coli* 0157:H7 in labneh as a pre and post fermentation contaminant. *J Food Protect*. 2000;63(5):608-12.
22. Prado CS, Santos WLM, Carvalho CR, Moreira EC, Costa JO. Atividade antimicrobiana de bactérias de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52(4):417-23.
23. Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-Arroume N, Hornez JP. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from na Algerian dairy product. *J Env Pub Health*. 2009;ID 678495: 6.
24. Al-Allaf MAH, Al-Rawi AMM, Al-Mola AT. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi J Vet Sci*. 2009;23:115-7.

## ***In vitro* biofilm production by *Staphylococcus* spp. strains isolated from finger-foods and snacks**

### **Produção *in vitro* de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolados de salgadinhos e lanches**

RIALA6/1554

Sarah Hwa In LEE<sup>1\*</sup>, Carlos Henrique CAMARGO<sup>1,2</sup>, Elisângela de Souza MIRANDA<sup>1</sup>, Ary FERNANDES JUNIOR<sup>1</sup>, Vera Lúcia Mores RALL<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu UNESP - Campus de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, S/N. CEP: 18618-970, Botucatu/SP, Brazil. E-mail: sarah.hwa.in.lee@gmail.com

<sup>2</sup>Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil.

Recebido: 16.10.2012 - Aceito para publicação: 11.05.2013

#### **RESUMO**

*Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores de doenças de origem alimentar e, embora a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA não contemple especificamente a detecção de estafilococos coagulase-negativa (ECN) em alimentos, sabe-se que este grupo de bactérias apresenta genes responsáveis pela formação de biofilme e produção de enterotoxinas. No presente estudo foram identificados os *S. aureus* e ECN em amostras de salgados, e sua capacidade de produzir biofilme *in vitro* foi avaliada por duas metodologias: ágar vermelho Congo e placa de microtitulação de poliestireno. Vinte e dois isolados de *Staphylococcus* pertencentes a oito diferentes espécies foram obtidos de 122 salgados, sanduíches e lanches. *S. aureus*, *S. warneri* e *S. haemolyticus* foram as espécies mais frequentemente isoladas. A produção de biofilme foi verificada em sete (31,8 %) isolados pela técnica de ágar vermelho Congo e em três (13,6 %) em placa de microtitulação. Nenhum isolado foi considerado positivo em ambas as metodologias. Apesar do baixo número de isolados, houve concordância de 59,1 % entre os testes. A capacidade de produzir biofilme é importante fator de virulência para *Staphylococcus* spp. e a detecção destes isolados de amostras de alimentos pode ajudar a definir o papel dos ECN como agentes patogênicos transmitidos por alimentos.

**Palavras-chave.** segurança alimentar, biofilmes, *Staphylococcus*.

#### **ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* is one of the most important food-borne pathogens, and although Brazilian Sanitation Surveillance Agency (ANVISA) does not specifically regards for coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) isolation from foods, it is known that this group of bacteria possesses genes associated with biofilm formation and enterotoxins production. In this context, the present study aimed at identifying the *S. aureus* and CNS in finger-foods and snacks samples, and to evaluate the ability of these strains to produce biofilm *in vitro* by means of two methodologies: Congo Red agar and polystyrene microplates cultures. Twenty-two staphylococcal isolates belonging to eight species were obtained from 122 finger-foods, sandwiches and ready-to-eat (RTE) food products. *S. aureus*, *S. warneri* and *S. haemolyticus* were the most frequent isolates. Biofilm production by *Staphylococcus* spp. was observed in seven (31.8 %) isolates by Congo Red agar technique and three (13.6 %) by polystyrene microplate methodology. There was no positive isolate biofilm producer by both methodologies. Despite the low number of isolates, a concordance of 59.1 % between the tests was found. The ability to produce biofilm is an important virulence factor in *Staphylococcus* spp., and it can support to define the role of CNS as food-borne pathogen.

**Keywords.** food safety, biofilms, *Staphylococcus*.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus* spp. are widespread microorganisms that may play an important role as agents of food-borne diseases<sup>1-4</sup>. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) are frequent bacteria on the human skin and mucous membranes, mainly as commensal flora<sup>5,6</sup>. Usually, the interaction between *S. aureus* and its human host appears to be non-hostile, since the bacterial colonization does not cause any symptoms. However, either by an increase in bacterial virulence or by awakenings of the immune system, being as an immune deficiency or an acquired state of immune suppression, *S. aureus* may become a deadly threat<sup>7</sup>. *Staphylococcus* species are the relevant biofilm-forming organisms. The biofilms are defined as a structured community of bacterial cells enclosed in a self-produced polymeric matrix and they are adherent to an inert or living surface<sup>8</sup>. Biofilms have been well studied in dairy and meat plants process<sup>9,10</sup>, cross-contamination<sup>8</sup> and mastitis<sup>11,12,13,14</sup>. There are few studies regarding the biofilm production ability of *Staphylococcus* spp., which are isolated from ready-to-eat, snacks and sandwiches. Snacks are fast foods usually derived from one or more basic food items and they are often eaten between meals<sup>15</sup>. This kind of food is highly consumed as it is often hot food prepared and served quickly, at low cost, and in places usually close to the workplace<sup>16</sup>; and it is consumed by people in both developed and developing countries, and by across-all-age groups<sup>16</sup>. This study aimed at identifying *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) in finger-foods and snacks sold in Botucatu, SP, and to evaluate the ability of these isolates in producing biofilm.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples collection

Food samples from 61 groceries, cafes, food trailers, snack bars, bakeries and street vendors, located in important areas in Botucatu, SP, were collected and analyzed twice (from August 2008 to March 2009). Meat, chicken, shrimp, ham-and-cheese, cheese, vegetable finger-food and sandwich samples were collected. These samples were transported in sterile 114 x 229 mm plastic bags (Inlab) under refrigeration, and they were kept in a cooler box until being processed in the same day in the lab.

### Microbiological Analysis

Following the methodology recommended by Lancette and Bennett<sup>17</sup>, 25 g of food were homogenized

in 225 mL of peptone water in plastic bags by using Stomacher Lab Blender 400 for 30 seconds. From this 10<sup>-1</sup> dilution, further dilutions were made. All of the culture media were purchased from Difco, Becton Dickinson (Sparks, MD).

*Staphylococcus* spp. were detected and identified according to the methodology described by Murray et al<sup>18</sup>. The phenotypic characteristics of biofilm production by *Staphylococcus* spp. were evaluated by two methodologies: cultivation on BHI agar supplemented with 0.8 % Congo Red<sup>19</sup> and biofilm assay using sterile 96-well bottom polystyrene tissue culture microplates with BHI broth medium<sup>20</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

Of 122 meat, chicken, shrimp, cheese, vegetable finger-food and sandwich samples analyzed in this study, *S. aureus* was the most isolated microorganism, which occurred in eight (6.6 %) samples (five chickens, two ham-and-cheese snacks and one meat finger-food). Different species of CNS were detected in 14 (11.4 %) samples. The most frequently isolated CNS were *S. warneri* (from one ham-and-cheese snack, two meat finger-food and one of chicken) and *S. haemolyticus* (from two cheese, two chicken finger-foods), which were found in four samples (3.3 %) each. *S. saprophyticus* was detected in two (1.6 %) samples, being one ham-and-cheese snack and one meat finger-food. The varied CNS species were detected, being each microorganism in each one (0.8 %) sample, being *S. simulans* in ham-and-cheese snack, *S. xylosus* in sandwich, *S. caprae* in cheese finger-food, and *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* in chicken finger-food. Co-presence with two different *Staphylococcus* species were observed in two samples: *S. aureus* and *S. warneri* in a meat finger-food, and *S. haemolyticus* and *S. caprae* in a cheese finger-food.

*S. aureus* might be used as an indicator for assessing the hygiene and sanitary conditions. The isolation of this bacterium from foods evidences the unhygienic conditions during their processing, storage, and other pertinent procedures<sup>21</sup>. This microorganism is a poor competitor but exert a high risk in foods if the normal microbiota has been destroyed or inhibited, e.g. as the cooked and salted meats<sup>22</sup>; also, toxin that causes illness might be produced by foods contaminated with *S. aureus*<sup>23</sup>.

Finger-foods and sandwiches pose as potential health risks associated with contamination of raw food

with pathogenic bacteria, contamination by handler during the food preparation, and also through post-cooking handling and cross-contamination<sup>24</sup>. A high tendency in rising the microbial load in snacks depends on the raw materials, the conventional methodologies of food processing and packaging, and the maintenance temperature, which might be a source for causing varied rates of deterioration of the read-to-eat (RTE) food products and snacks in developing countries<sup>15</sup>.

Biofilm production was assessed in eight *S. aureus* strains and in 14 CNS isolates using Congo Red agar and polystyrene microplate adherence techniques. Red-Congo was used as pH indicator, and the black coloration indicated that the pH range was from 3.0 to 5.2. The cultures were considered positive, when the black rough colonies were grown<sup>19</sup>. By mean of Congo Red agar technique, the biofilm production was found in seven (31.8 %) strains. On the other hand, by microplate assay, three (13.6 %) strains only were biofilm producer. The results were shown in the Table.

**Table 1.** Results of biofilm production by *Staphylococcus* spp., using Congo Red agar and polystyrenemicroplate assay

<i>Staphylococcus</i> spp.	N	Biofilm production	
		Congo Red agar	Microplate
<i>S. aureus</i>	8	2	2
<i>S. warneri</i>	4	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	0
<i>S. saprophyticus</i>	2	2	0
<i>S. simulans</i>	1	1	0
<i>S. xylosus</i>	1	1	0
<i>S. caprae</i>	1	0	0
<i>S. schleiferi</i> subs. <i>schleiferi</i> .	1	0	1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>7 (31.8 %)</b>	<b>3 (13.6 %)</b>

None of the strains was positive in both methodologies, which indicated the occurrence of noncompliant results. Of 22 isolated strains, 13 were negative in both techniques; therefore, the overall concordance was of 59.1 % between the two tests (Kappa index = -0.1647), which indicated a good specificity. Due to the low number of isolates, it was not determined which biofilm assay was the most efficient.

*S. aureus* was the foremost biofilm producer, as 4/8 (50 %) isolates formed biofilm, independently of the employed methodology. Among CNS, 6/14 (42.9 %) were biofilm-forming bacteria. The highest biofilm production by *S. aureus* was not statistically significant, when the CNS rates were considered (p = 0,546).

Very few data on the biofilm production by *Staphylococcus* spp. isolated from finger-foods were found in the specific literature, but biofilms formation in other kind of food were usually analyzed in RTE food samples. Podkowik et al<sup>25</sup> found 67 staphylococcal isolates belonging to 12 species, isolated from 70 RTE food products; *S. aureus* (35.7 %) and *S. epidermidis* (18.5 %) were predominant bacteria. Interestingly, in the present study, no *S. epidermidis* was isolated, even it is one of the most frequent species in the skin microbiota. *S. aureus* was isolated from eight (6.5 %) food samples, being at lower rate than those 35.7 % reported by the above referred authors<sup>25</sup>. These divergent findings could be occurred because different types of food were analyzed in every investigation. Podkowik et al<sup>25</sup> analyzed foods prepared with porcine, bovine, and chicken meat, and the fried or roasted finger-food were the investigated samples in the present study. On that account, the probability of recovering *Staphylococcus* isolates from meat-RTE food is higher, because of the use of different type of preparation, cooking and handling procedures. Podkowik et al<sup>25</sup> performed the detection of virulence-associated genes and the biofilm formation of *S. epidermidis* only; from 13 isolates, five (38.5 %) harbored the *ica* operon, and they formed biofilm. Those values were slightly lower than the findings detected in the present study for *S. aureus* and CNS by means of Congo Red agar assay (31.8 %). Møretro et al<sup>26</sup> also found lower percentage, using 144 *S. aureus* isolated from three separate Norwegian meat- and poultry-processing plants by swabbing the food cuttings and other contact surfaces and equipment; and 28 (19.5 %) were considered biofilm producers. By means of microplate assay, the findings observed in the present investigation were similar in three samples (13.6 %) only. The finger-foods consumed in Brazil are usually fried food. Thus, considering that the employed temperatures for food frying do not reach the degrees needed to eliminate the microorganisms, it enhances the demands concerning to the precise care for the foods handling during their preparation. These procedures will decrease the risk of contaminating food and avoiding compromising the consumers' health<sup>27</sup>.

## CONCLUSION

This study verified a considerable quantity of biofilm-producer strains, although the number of isolates was small. These results show the ability of *Staphylococcus* spp. isolated from food in forming

biofilm *in vitro*, and it may represent an advantage in bacterial permanence in the environment, utensils and equipments enhancing the importance of hygienic measures to avoid food contamination and cross contamination. Also, owing to the difficulty in eradicating biofilms, it is crucial to carry on the microbiological control before biofilms are formed, and to make use of hygienic principles for cleaning and sanitizing the utensils and equipments to prevent potential risk of food-borne diseases.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the research fellowship grant provided to student Sarah Hwa In Lee.

#### REFERENCES

1. Miwa N, Kawamura A, Masuda T, Akiyama M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2001;64:361-6.
2. Do Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos A, Fari, ME et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol*. 2002;19:9-14.
3. Do Carmo LS, Souza Dias R., Linardi VR, Sena MJ, Santos DA. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 2003;46:581-6.
4. Colombari V, Mayer MD, Laicini ZM, Mamizuka E, Franco BD, Destro MT et al. Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: Phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *J Food Prot*. 2007;70:489-93.
5. Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *J Appl Microbiol*. 1990;19:1-8.
6. Noble WC. Systematics and the natural history of Staphylococci. *J Appl Microbiol*. 1990;69:39-48.
7. Holtfreter S, Kolata J, Bröker BM. Towards the immune proteome of *Staphylococcus aureus* – The anti-*S. aureus* antibody response. *Int J Food Microbiol*. 2010;300:176-92.
8. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol*. 2010;5:917-33.
9. Jessen B, Lammert L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2003;51:265-9.
10. Somers EB, Wong AC. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *J Food Prot*. 2004;67:2218-29.
11. Harraghy N, Seiler S, Jacobs K, Hannig M, Menger MD, Herrmann M. Advances in *in vitro* and *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int J Artif Organs*. 2006;29:368-78.
12. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gastra W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006a;53:326-32.
13. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? *Vet J*. 2006b;171:398-407.
14. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol*. 2007;121:1-17.
15. Ezekiel CN, Kayode FO, Fapohunda SO, Olorunfemi MF, Kponi BT. Aflatoxigenic moulds and aflatoxins in street-vended snacks in Lagos, Nigeria. *J Food Saf*. 2012;14:83-8.
16. Hanashiro A, Morita M, Matté GR, Matté MH, Torres EAFS. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. *Food Control*. 2005;16:439-44.
17. Lancette GA, Bennett RW. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC):Apha, 2001 p.387-403.
18. Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9<sup>th</sup> ed. Washington (DC): ASM Press; 2007.
19. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989;42:872-4.
20. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*. 2003;92:179-85.
21. Tavakoli HR, Soltani M, Bahonar A. Isolation of some human pathogens from fresh and smoked shad (*Alosa kessleri*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iran J Fish Sci*. 2012;11:424-9.
22. Rode TM, Langsrud S, Holck A., Møretro, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol*. 2007;116:372-383.
23. Feglo P, Sakyi K. Bacterial contamination of street vending food in Kumasi, Ghana. *J Med Biomed Sci*. 2012;1:1-8.
24. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM, Zurera G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci Technol*. 2008;19:130-43.
25. Podkowik M, Jarosław B, Bania J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9:91-9.
26. Møretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:5648-55.
27. Rodrigues LB, Santos LR, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, Oliveira AP et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol*. 2010;41:1082-5.

## Desenvolvimento e avaliação físico-química, sensorial e da estabilidade de ácido ascórbico de doce de leite com pimenta

### Development of red pepper-containing dulce de leche and evaluation of its physico-chemical and sensorial characteristics, and ascorbic acid stability

RIALA6/1555

Camila Pegorer MAZINI<sup>1</sup>, Gabriella Giani PIERETTI<sup>1</sup>, Ivanise Guilherme BRANCO<sup>2</sup>, Monica Regina da Silva SCAPIM<sup>1</sup>, Grasielle Scaramal MADRONA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Leites, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Campus Maringá, CEP: 87020-900, Maringá, PR, Brasil, E-mail: gsmadrona@uem.br

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, SP, Brasil

Recebido: 22.01.2013 – Aceito para publicação: 30.06.2013

#### RESUMO

O doce de leite é um alimento muito consumido em todo o Brasil, com sabor, cor, aroma e texturas características. A pimenta dedo-de-moça também está presente na mesa dos consumidores e é rica em ácido ascórbico (vitamina C), que é excelente antioxidante. No presente trabalho, foi elaborado o doce de leite adicionado de pimenta dedo-de-moça. No produto desenvolvido, foi determinada a composição centesimal, e foi avaliada a aceitação do doce quanto aos atributos sensoriais de cor, aroma, sabor, textura e aceitação global. O teor de ácido ascórbico foi quantificado em diferentes períodos de armazenamento (0, 30 e 60 dias). O doce de leite com pimenta preparado apresentou composição centesimal de acordo com a legislação vigente. O teor de ácido ascórbico mostrou-se praticamente estável durante o período de armazenamento, e o produto demonstrou boa aceitação na análise sensorial.

**Palavras-chave.** doce de leite, pimenta dedo-de-moça, ácido ascórbico.

#### ABSTRACT

The *dulce de leche* or milk candy is a food widely consumed in Brazil, which shows typical characteristics of taste, color, flavor and texture. The *lady-finger* red pepper is regularly present on the Brazilian people table as this product contains a pungent flavor favoring various spices; and it is also rich in ascorbic acid (vitamin C) which is an excellent antioxidant. This study aimed at developing a *dulce de leche* containing lady-finger red pepper, and to determine the composition of the product. Also, the ascorbic acid contents were quantified in products stored for different periods (0, 30 and 60 days). The product acceptance by consumers on the sensory characteristics was evaluated by means of hedonic scale for color, aroma, flavor and texture attributes. The composition of the product was in accordance with the legislation in force, and the ascorbic acid contents were practically stable during the storage, and the sensory analyses indicated that the red pepper-containing *dulce de leche* was well accepted.

**Keywords.** *dulce de leche*, lady-finger red pepper, ascorbic acid.

## INTRODUÇÃO

O doce de leite é um alimento muito consumido na América Latina, em especial no Brasil e na Argentina<sup>1</sup>. Segundo Della Lucia et al<sup>2</sup>, é muito consumido como ingrediente para confeitos, bolos, sorvetes e também como sobremesa ou no acompanhamento de queijo, pão ou biscoito.

Na fabricação do doce, deve-se fazer uso de leite de qualidade, para proporcionar um doce de boa qualidade. Um dos problemas que devem ser controlados é a estabilidade microbiológica, tecnológica e física<sup>3</sup>.

O desenvolvimento de novos produtos pode manter pequenas indústrias em um mercado cada vez mais competitivo. Sendo assim, a indústria de laticínios tem buscado alternativas como novas matérias-primas na elaboração de seus produtos. Nesse contexto, mostra-se interessante o desenvolvimento de um produto diferenciado, por exemplo, um doce de leite com pimenta.

Pimentas vermelhas, como a pimenta dedo-de-moça do gênero *Capcicum*, são muito utilizadas como temperos para diversos pratos, principalmente pelo sabor pungente (“picante”) que apresentam. As características específicas dessas pimentas se devem às substâncias, como a capsaicina, os carotenoides e o ácido ascórbico. A presença do ácido ascórbico, confere às pimentas poder antioxidante considerável<sup>4</sup>, que pode prevenir ou reduzir a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causados por espécies de oxigênio reativo, que incluem os radicais livres que ao reagir com estes, impede os efeitos ruins ao organismo<sup>5</sup>.

O tempo de armazenamento do doce de leite é relativamente longo devido ao açúcar, que além de atuar no sabor, corpo e cor do doce, é um conservante. O maior problema que o doce apresenta ao longo do tempo de armazenamento é a cristalização, que decorre da formação de grandes cristais de lactose<sup>3</sup>.

Por apresentar efeito antioxidante, o ácido ascórbico pode ser utilizado como conservante em alimentos, tendo ainda a vantagem de ser natural<sup>6</sup>. Ao adicionar a pimenta dedo-de-moça ao doce de leite, atribui-se o conservante natural e ainda aproveita-se o sabor pungente e contraditório ao doce, tornando-o, assim, um produto novo e com sabor diferenciado.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e analisar sensorial e físico-quimicamente o doce de leite com pimenta

dedo-de-moça, além de quantificar a disponibilidade do ácido ascórbico presente no produto durante o armazenamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Processamento e formulação do doce de leite com pimenta

A metodologia empregada na produção do doce de leite com pimenta é a mesma descrita por Hosken<sup>7</sup>, sendo modificada apenas na última etapa, na qual é acrescentada a pimenta dedo-de-moça, que foi previamente higienizada em solução de 100 ppm de cloro por 20 minutos, enxaguada, as sementes retiradas e, em seguida, trituradas.

Após adição dos ingredientes, iniciou-se o processo de concentração do doce de leite em tacho aberto, com agitação até 65° Brix, que foi medido em triplicatas por um refratômetro de mesa com leitura refratométrica a 20 °C. Após atingir a concentração desejada, foi realizado o resfriamento à 70 °C, depois realizou-se o envase em potes de vidro e, por último, um resfriamento até temperatura ambiente.

Foram testadas, previamente, diferentes concentrações de pimenta e, ao final, foram selecionadas três formulações, cujas porcentagens dos ingredientes estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Ingredientes das formulações de doce de leite com pimenta

Ingredientes	1 %	2 %	3 %
Leite (%)	79,75	79,75	79,75
Açúcar (%)	19,94	19,94	19,94
Amido (%)	0,25	0,25	0,25
Bicarbonato de sódio (%)	0,06	0,06	0,06
Pimenta dedo-de-moça (%)	1	2	3
Total (%)	100	100	100

### Análises físico-químicas

Os teores de umidade, gorduras totais e cinzas foram determinados por metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>8</sup>. Na determinação do teor de proteínas, foi utilizado o método segundo o manual AOAC<sup>9</sup>.

A quantificação do ácido ascórbico foi feita pelo método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>10</sup>. Análises de ácido ascórbico no produto foram realizadas em diferentes períodos (0, 30 e 60 dias), para verificar sua estabilidade durante o armazenamento.

### Análise de cor e textura instrumental

A cor do doce de leite com pimenta foi avaliada por meio de um colorímetro portátil Minolta® CR10, com esfera de integração e ângulo de visão de 3°, ou seja, iluminação d/3 e iluminante D65. O sistema utilizado foi o CIEL\*a\*b\*, com o qual foram medidas as coordenadas: L\*, representando a luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); a\* que representa uma escala de tonalidade variando de vermelho (0 + a) a verde (0 - a) e b\* que representa uma escala de amarelo (0 + b) a azul (0 - b). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

A análise de textura do produto foi realizada em Texturômetro modelo Stable Micro Systems Texture Analyser TAXT Plus (Texture Technologies Corp, Inglaterra). As características do ensaio foram: Acessório: Probe 36 mm; Modo: força medida em compressão; Opção: retornar ao início; Velocidade de pré-teste: 2,0 mm/s; Velocidade de teste: 3,0 mm/s; Velocidade de pós-teste: 7,0 mm/s; Distância: 10 mm. Essa análise foi realizada em duplicata.

### Análise sensorial

Na avaliação da aceitação do doce de leite com pimenta foi utilizada escala hedônica de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 pontos (gostei muitíssimo). A análise foi realizada no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, com 101 provadores não treinados de ambos os sexos, com o parecer aprovado pelo comitê de ética da UEM com número CAAE: 02643312.4.0000.0104.

Foram avaliados os atributos cor, aroma, sabor, textura e aparência global. As amostras foram servidas puras em copos descartáveis codificados com números de três dígitos, acompanhadas de água para ser intercalada entre as amostras.

A intenção de compra foi avaliada em escala de 1 (certamente não compraria) a 3 (certamente compraria). Foi calculado o índice de aceitação do doce de leite com pimenta através da fórmula:

$$IA = \frac{X * 100}{N}$$

Onde:

X= média da amostra;

N= nota máxima da amostra dada pelos provadores

### Análise dos dados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA) e cálculo de

médias por Tukey a 5 % de significância, teste que deve ser aplicado toda vez que se pretende comparar as médias dos tratamentos.

## RESULTADOS

### Composição Centesimal

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises de umidade, cinzas, proteínas, gorduras totais, ácido ascórbico e ainda os valores de referência da legislação vigente no tempo zero.

**Tabela 2.** Tabela de composição centesimal em comparação à legislação vigente no tempo zero

Análises	Legislação**	1 %	2 %	3 %
Umidade (%)	máx. 30,0 %	28,12 ± 0,0072 <sup>a</sup>	29,60 ± 0,0648 <sup>a</sup>	30,06 ± 0,0840 <sup>a</sup>
		1,58 ± 0,00005 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,00005 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,00245 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	máx. 2,0 %	6,40 ± 0,00063 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,00000 <sup>a</sup>	6,16 ± 0,00000 <sup>a</sup>
		5,16 ± 0,0002 <sup>a</sup>	4,61 ± 0,0049 <sup>a</sup>	4,71 ± 0,00003 <sup>a</sup>
Proteínas (%)	mín. 6,0 %	5,16 ± 0,0002 <sup>a</sup>	4,61 ± 0,0049 <sup>a</sup>	4,71 ± 0,00003 <sup>a</sup>
		0,0002 <sup>a</sup>	0,0049 <sup>a</sup>	0,00003 <sup>a</sup>
Gorduras Totais (%)	mín. 2,0 %	51,95	50,05	48,51
		-	-	-
Carboidratos (%)	-	51,95	50,05	48,51

\*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5 % de significância

\*\* BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Portaria N° 354, de 4 de setembro de 1997<sup>11</sup>

Pode-se verificar que não houve diferença significativa, ao nível de 5 % de significância, entre as diferentes formulações para todas as análises, mostrando que a adição de até 3 % de pimenta dedo-de-moça não acarreta alterações na composição centesimal do doce de leite.

Em comparação a legislação vigente, ou seja, Portaria n° 354/97<sup>11</sup>, nota-se que o novo produto, para as 3 formulações testadas, está dentro dos padrões exigidos.

Segundo Feihrmann et al<sup>12</sup>, que também determinaram a composição centesimal de doce de leite pastoso com leite semidesnatado elaborado em um evaporador, obtiveram umidade de 33,4 %, lipídeos de 4,75 %, proteínas de 10,2 % e cinzas de 2,41 %. Comparando com os autores, o doce de leite em estudo apresenta poucas diferenças na composição centesimal. É importante ressaltar que o leite utilizado pelos autores foi semidesnatado e, para elaboração do doce de leite com pimenta, foi utilizado o leite integral, o que explica a variação de gorduras/lipídeos e proteínas apresentada.

A composição química de vários doces de leite adquiridos no comércio de São Paulo e Paraná foi avaliada por Demiate et al<sup>1</sup>. Os autores observaram teor médio de 26,80 % de umidade, 1,41 % de cinzas, 3,90 % de lipídeos e 7,07 % de proteínas que, comparados ao trabalho proposto, apresentaram poucas variações. Essas pequenas variações podem ser explicadas pela tecnologia utilizada na fabricação dos doces de leite comerciais.

### Estabilidade do ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi quantificado nas amostras de doce de leite no período de 2 meses, sendo realizadas análises no tempo 0, 30 e 60 dias. A Tabela 3 apresenta os resultados dessas análises nos diferentes tempos.

Não houve diferença significativa entre o teor de ácido ascórbico presente nas amostras, ao nível de 5 % de significância, ao longo do período de armazenamento (Tabela 3).

Esses resultados indicam que se o doce de leite for armazenado de maneira correta, o teor de ácido ascórbico presente na pimenta continuará estável, proporcionando um doce de leite com pimenta de valor considerável de vitamina C, no período de 60 dias, conforme analisado.

**Tabela 3.** Concentração (mg/100g de produto) de ácido ascórbico durante o tempo de armazenamento

Tempo (dias)	1 %	2 %	3 %
0	6,79 ± 0,05 <sup>aA</sup>	8,11 ± 0,23 <sup>aA</sup>	8,50 ± 0,06 <sup>aA</sup>
30	6,45 ± 0,22 <sup>aA</sup>	6,21 ± 0,00 <sup>aA</sup>	8,12 ± 0,23 <sup>aA</sup>
60	6,83 ± 0,02 <sup>aA</sup>	5,99 ± 0,05 <sup>aA</sup>	8,55 ± 0,23 <sup>aA</sup>

\*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5 % de significância  
 \*\*Letras iguais maiúsculas na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5 % de significância.

### Cor e textura

Na Tabela 4, são apresentados os resultados da análise de cor para as três formulações.

Pode-se observar que os resultados da análise de cor (L, a\* e b\*) não diferem entre si, ao nível de 5 % de significância para as diferentes concentrações de pimenta. Isso demonstra que a adição de até 3 % de pimenta dedo-de-moça não interfere na cor do doce de leite nas concentrações avaliadas.

Bellarde<sup>13</sup> analisou instrumentalmente a cor de doce de leite (com mesmo teor em °Brix), obtendo para “L” o valor de 50,77, para “a\*” 7,45, e para “b\*” 24,21. Comparando esses resultados com o doce de leite com pimenta, nota-se poucas variações desses parâmetros.

Observa-se na Tabela 4 que não houve diferença significativa entre os resultados de textura. Isso se deve ao fato de que a formulação do doce de leite era a mesma para todas as concentrações, já que a variação de pimenta adicionada depois do doce pronto foi pequena.

**Tabela 4.** Tabela de resultados da análise de cor de amostras de doce de leite acrescido de diferentes teores de pimenta dedo-de-moça

Parâmetros	Concentração de pimenta dedo-de-moça		
	1 %	2 %	3 %
L	57,51 ± 6,71 <sup>a</sup>	53,69 ± 5,24 <sup>a</sup>	53,56 ± 3,87 <sup>a</sup>
A	5,13 ± 0,56 <sup>a</sup>	5,34 ± 0,14 <sup>a</sup>	6,61 ± 0,58 <sup>a</sup>
B	23,71 ± 9,86 <sup>a</sup>	20,32 ± 2,64 <sup>a</sup>	21,15 ± 0,64 <sup>a</sup>
Textura (Kgf)	952,45 ± 220,005 <sup>a</sup>	1339,05 ± 125,044 <sup>a</sup>	1005,9 ± 56,179 <sup>a</sup>

\*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5 % de significância

### Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial das diferentes formulações de doce de leite com pimenta estão na Tabela 5.

Observa-se na Tabela 5 que não houve diferença significativa entre as amostras, ao nível de 5 % de significância, para todos os atributos avaliados.

É importante ressaltar que a análise sensorial foi realizada com provadores não treinados, que gostavam ou não de pimenta. O sabor pungente da pimenta não agrada a todos, ainda mais adicionado a um doce, contrapondo o característico sabor de doce de leite.

Para um produto ser bem aceito, o índice de aceitação deve ser superior a 70 %, assim, todas as formulações foram bem aceitas, apresentando índices que variam de 76,89 % (para formulação com 3 %) e 84,04 % (para formulação com 1 %).

Madrona et al<sup>14</sup> realizaram análise sensorial de doces de leite elaborados com diferentes concentrações de soro de leite em substituição ao leite, comparando com o doce de leite tradicional (sem adição de soro), e obtiveram

**Tabela 5.** Resultados da análise sensorial do doce de leite com pimenta dedo-de-moça

Atributos	1 %	2 %	3 %
Cor	7,44 ± 1,89 <sup>a</sup>	7,31 ± 1,96 <sup>a</sup>	7,29 ± 2,33 <sup>a</sup>
Aroma	7,41 ± 1,76 <sup>a</sup>	7,02 ± 2,40 <sup>a</sup>	7,05 ± 2,21 <sup>a</sup>
Sabor	6,93 ± 3,26 <sup>a</sup>	6,15 ± 4,60 <sup>a</sup>	5,57 ± 5,95 <sup>a</sup>
Textura	7,32 ± 2,54 <sup>a</sup>	7,36 ± 2,15 <sup>a</sup>	7,15 ± 2,61 <sup>a</sup>
Aparência Global	7,56 ± 1,65 <sup>a</sup>	7,22 ± 2,02 <sup>a</sup>	6,92 ± 3,23 <sup>a</sup>
Intenção de Compra	2,22 ± 0,45 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,56 <sup>a</sup>
Índice de aceitação	84,04 %	80,30 %	76,89 %

\*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si ao nível de 5 % de significância

média 6,6 no aspecto geral para o doce de leite sem adição de soro. O doce de leite com pimenta obteve as seguintes notas na avaliação global: 7,56 para concentração de 1 % de pimenta, 7,22 para 2 % de pimenta e 6,92 para 3 % de pimenta. Comparando os resultados obtidos pelos autores com presente trabalho, pode-se dizer que o doce de leite com pimenta apresentou aparência global similar ao doce de leite tradicional, sendo favorável para comercialização.

Em relação à intenção de compra, 34,95 % dos provadores certamente comprariam o doce de leite com 1 % de pimenta dedo-de-moça, 51,45 % talvez comprariam e 13,59 % certamente não comprariam. Para o doce com 2 % de pimenta, observamos que 20,38 % dos provadores certamente comprariam, 46,60 % talvez comprariam, e 33,01 % certamente não comprariam. Para a formulação com 3 % de pimenta, 17,47 % dos provadores certamente comprariam, 36,89 % talvez comprariam, e 45,63 % certamente não comprariam. Esses resultados indicam que todas as formulações são estatisticamente iguais e, ainda, que todas foram bem aceitas, apresentando índices de aceitação superiores a 76,89 %.

Em geral, pode-se observar que os doces avaliados apresentaram alto índice de aceitação, assim como já observado na literatura. Feihmann et al<sup>12</sup>, que produziram um doce de leite com leite semidesnatado concentrado e realizaram um teste de preferência, observaram que o produto foi aceito por 93 % dos provadores, indicando que houve um bom índice de aceitação do produto.

## CONCLUSÃO

O doce de leite com pimenta dedo-de-moça foi bem aceito na análise sensorial, sendo que os provadores não notaram diferença entre as diferentes concentrações de pimenta para os atributos avaliados. Na intenção de compra, as formulações apresentaram-se estatisticamente iguais. O ácido ascórbico presente no doce de leite manteve-se estável durante o período armazenamento.

## REFERÊNCIAS

1. Demiate IM, Konkel FE, Pedrosa RA. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(1):108-14.
2. Della Lucia AASM, Gomes ED, Nachtigall AM, Cavalcante JFM, Minim VPR. Perfil sensorial de doce de leite pastoso. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2003;334:45-50.
3. Coelho EBB, Coelho DT, Pinheiro AJR, Chaves JBP, Pereira AS. Utilização da beta-d-galactosidade no controle da cristalização do doce de leite. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 1982;37:7-9.
4. Kappel VD. Avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2007.
5. Couto MAL, Brazaca SGC. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(1):15-9.
6. Dutra FLA, Branco IG, Madrona GS, Haminuk CI. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. *Rev Bras Tecnol Agroind*. 2010;4(2):243-51.
7. Hosken FS. Doce de leite – Durabilidade e cristalização. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 1969;24(147):10-7.
8. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos, 4ª Ed. São Paulo: IMESP, 2008.
9. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 16th ed., Washington, 1999.
10. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V. 1: Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos, 3ª Ed. São Paulo: IMESP, 1985.
11. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04/09/97. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.
12. Feirmann AC, Cichoski AJ, Jacques AR. Doce de leite elaborado em evaporador, com leite semidesnatado concentrado. *Hig Alim*. 2006;20(141):29-32.
13. Bellarde FB. Elaboração de doce de leite pastoso com substituição parcial de sólidos do leite por concentrado proteico do soro. *Rev Uniar*. 2006;17(18):249-55.
14. Madrona GS, Zotarelli MF, Bergamasco R, Branco IG. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(4):1-8.

## Avaliação da qualidade do camarão salgado seco (aviú) e da farinha de peixe (piracuí) comercializados em mercados varejistas da cidade de Belém, Pará

### Microbiological and physico-chemical qualities of dried-salted shrimp (“aviú”) and of “piracuí” type fish meal sold in retail markets in Belém, Pará – Brazil

RIALA6/1556

Emilia do Socorro Conceição de Lima NUNES<sup>1\*</sup>, Ruth Helena Falesi Palha de Moraes BITTENCOURT<sup>2</sup>, Moacir Cerqueira da SILVA<sup>2</sup>, Eliane Teixeira MÁRSICO<sup>3</sup>, Robson Maia FRANCO<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Campus Universitário de Castanhal II, BR 316 km 61. Castanhal, Pará, CEP 68.740-970. E-mail: emiliasclnunes@ig.com.br, emilia@ufpa.br

<sup>2</sup>Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, PA

<sup>3</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ

Recebido: 16.12.2012 - Aceito para publicação: 10.06.2013

#### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade de camarão salgado seco (aviú) e de farinha de peixe (piracuí), foram obtidas 27 amostras, analisadas seguindo metodologias oficiais. Os resultados físico-químicos foram, em média, de 24,0 % e 18,76 % de umidade, 22,68 % e 12,91 % de cinzas, 15,67 % e 8,20 % de cloretos, 0,61 e 0,57 de atividade de água, respectivamente, para aviú e piracuí; ademais, 30,77 % de amostras de aviú e 7,14 % de piracuí excederam o limite máximo permitido para cinzas. O ranço oxidativo foi detectado em 74,07 % das amostras pesquisadas. Das 21 amostras analisadas para contagem de fungos, 100 % apresentaram contaminação. As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva não atenderam aos respectivos valores máximos regulamentados, em 61,54 % das amostras de aviú e em 78,87 % das de piracuí. *Enterococcus* spp. foi detectado em 69,23 % e 64,28 %, respectivamente, das de aviú e piracuí. Houve ocorrência de *Salmonella* spp. em cinco amostras. Estes alimentos comercializados em Belém apresentaram condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e inexistente qualidade.

**Palavras-chave.** qualidade microbiológica, qualidade físico-química, camarão Aviú, farinha de peixe Piracuí.

#### ABSTRACT

Twenty-seven samples of dried-salted shrimp (“aviú”) and “piracuí” type fish meal were tested for evaluating the physical-chemical and microbiology qualities. The mean values of moisture, ash, salt contents and water activity (Wa) were 24.0 % and 18.76 %, 22.68 % and 12.91 %, 15.67 % and 8.20 %, 0.61 and 0.57 for aviú and piracuí samples, respectively. The ash values were above the maximum limit permitted by legislation in 30.77 % and 7.14 % of “aviú” and “piracuí” samples, respectively. Oxidative rancidity was showed in 74.07 % of samples. Yeast and mold were detected in all analyzed samples (n = 21). Coagulase-positive *Staphylococcus* counts were above the maximum limit permitted by legislation in 61.54 % and 78.87 % of “aviú” and “piracuí” samples, respectively. *Enterococcus* spp. was detected in 69.23 % and 64.28 % of “aviú” and “piracuí” samples, respectively. *Salmonella* spp. was isolated from five samples. The dried-salted shrimp (“aviú”) and the “piracuí” type fish meal sold in Belém showed unsatisfactory hygienic-sanitary quality, and microbiologic characteristics of a potential risk to public health.

**Keywords.** microbiology quality, physical-chemical quality, Aviú, Piracuí.

## INTRODUÇÃO

O consumo de pescado na região Norte caracteriza-se por uma grande variedade de peixes de água doce, comercializados na forma inteira e resfriada, destacando-se espécies como: dourada, pescada, piramutaba, mapará, tamoatá, curimatã, filhote, tucunaré, pirarucu, dentre outros<sup>1</sup>, e alguns crustáceos de água doce e salgada<sup>2</sup>.

Adicionalmente, os pescados e seus derivados salgados secos, como o pirarucu, o camarão aviú e a farinha de peixe piracuí são amplamente comercializados em feiras livres e supermercados das cidades de Belém e Manaus, com elevado valor comercial, cultural e econômico.

O aviú é um micro camarão, de aproximadamente oito mm de comprimento, da família dos Sergestidae (*Acetes americanus* e *A. marinus*), de água doce, abundante na superfície das águas depois das primeiras enchentes dos rios amazônicos, principalmente na região da foz do rio Tocantins e águas rasas do rio Tapajós, nos arredores de Santarém, Pará<sup>3,4</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Camarão salgado-seco Aviú  
Fonte: Arquivo pessoal (2012)

Nos mercados varejistas das principais cidades da região Norte, o minúsculo aviú é frequentemente encontrado na forma salgado seco, e está presente em uma grande variedade de pratos regionais, como: recheio de tortas, ensopados, omeletes, sopas, farofas, salgados, guisados e fritadas, aos quais os habitantes da região atribuem propriedades rejuvenescentes<sup>3</sup>.

O aviú é um produto obtido da cocção do camarão em salmoura com aproximadamente uma parte de sal para três de camarão, seguido de drenagem em esteira de folha de palmeira, sob luz do sol ou em cofos cobertos; tal

processo baseia-se no princípio da desidratação osmótica, que aumenta o poder de conservação do pescado, inibindo a atividade enzimática e diminuindo a de água; porém, a oxidação dos lipídios é favorecida ocasionando odor desagradável e sabor adstringente com rancificação do óleo<sup>5</sup>.

Outro produto de origem animal amplamente comercializado na região Norte do país, é um derivado do pescado, denominado piracuí, considerado uma farinha de peixe. Entretanto, a farinha de pescado, de acordo com a legislação brasileira, é classificada como um subproduto não-comestível, elaborada a partir de todo resíduo resultante de manipulações e de pescado condenado<sup>6</sup>.

Dentro desse contexto, apesar do piracuí (pira = peixe; cui = farinha) ser denominado farinha de peixe, o mesmo é destinado para o consumo humano, sendo um derivado de pescado, de origem indígena; tradicionalmente consumido em toda a região amazônica, surgiu como forma de conservar os alimentos na época das águas grandes, quando os peixes ficavam escassos em determinadas áreas e os índios os desidratavam, resultando nesse produto único da região amazônica<sup>7,8</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Farinha de peixe Piracuí  
Fonte: Arquivo pessoal (2012)

Tradicionalmente, o piracuí é produzido a partir do músculo de peixe, seco e desfiado, e representa uma alternativa nutricional e econômica para o aproveitamento do excesso de pescado fresco de baixo valor comercial, pois é uma excelente fonte proteica: em média com 70 % de proteína de ótima digestibilidade, sendo um produto que compensa a falta de pescado em determinadas épocas do ano na dieta da população, especialmente a de baixa renda<sup>7</sup>.

Atualmente o preparo desta farinha está restrito a algumas cidades das regiões Norte, como Prainha e Santarém, no Estado do Pará, e Manaus, no Estado do

Amazonas, onde pescadores de comunidades utilizam, tradicionalmente, como matéria-prima, o peixe acari ou acari-bodó (*Liposarcus pardalis*); entretanto, outras espécies, como o tamuatá (*Callichthys callichthys*) podem ser utilizadas<sup>9,10</sup>. Sua comercialização e consumo, por outro lado, ocorre em todas as principais cidades da região Norte, destacando-se as capitais de Belém e Manaus como grandes centros consumidores<sup>11,12</sup>.

Os peixes acari-bodó e o tamuatá caracterizam-se por apresentarem o corpo revestido de placas ósseas e vivem no fundo dos rios, especialmente em leitos rochosos, alimentando-se de lodo, vegetais e restos orgânicos; têm respiração branquial e também são capazes de absorver o oxigênio atmosférico<sup>9</sup>. Na época da seca dos rios, essas espécies ficam presas no solo úmido, sendo facilmente capturadas e aproveitadas para o preparo do piracuí. Essas espécies apresentam acelerada deterioração após a pesca, motivo que reforça a sua utilização para o preparo da farinha de piracuí, no lugar da comercialização *in natura*<sup>10</sup>.

A farinha de piracuí é comercializada nas feiras livres em sacos de aniagem, sem nenhum cuidado higiênico. Ao contrário do Concentrado Protéico de Peixe (CPP) tradicional, o piracuí tem ótima aceitabilidade, sendo consumido puro ou misturado a outros alimentos, na forma de bolinhos de peixe, tortas, omeletes, sopas, ensopados, risotos e suplemento proteico. Também pode ser empregada em diferentes situações: desde programas de merenda escolar, em internatos, nas dietas hospitalares e até nas rações operacionais das Forças Armadas durante manobras na região amazônica<sup>7,9-11</sup>.

O processo de produção do piracuí é artesanal e emprega operações de tratamento térmico, eliminação de resíduos e desidratação. O peixe ainda fresco é cozido ou assado, em seguida separa-se a carne da carcaça e dos ossos; a mesma, assim obtida, é desidratada em tachos de barro ou fornos abertos, sob uma chapa aquecida; adiciona-se sal e o produto final é resfriado em temperatura ambiente e, depois, embalado<sup>13</sup>.

O processamento artesanal da produção do aviú e do piracuí impõe sérias restrições sob o ponto de vista sanitário e comercial desses produtos para o consumidor, pois o manuseio pode acarretar contaminações caso os cuidados higiênico-sanitários não sejam atendidos. Devido à aceitação e ao valor comercial desses derivados do pescado, no mercado local, faz-se necessária a padronização de métodos de produção e a fixação de padrões e características físico-químicas e microbiológicas para seu consumo.

O objetivo deste estudo foi avaliar, a partir dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos, a qualidade do camarão salgado seco aviú e da farinha de peixe piracuí destinada ao consumo humano e comercializados na cidade de Belém, Pará.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas mensalmente, no período de seis meses (novembro/2010 a abril/2011), 27 amostras, com 500 gramas cada, sendo 13 delas, de camarão salgado-seco aviú e 14 de farinha de peixe piracuí, em supermercados e feiras livres na cidade de Belém. As amostras obtidas nas feiras estavam expostas à venda sem embalagem, a granel, mantidas em temperatura ambiente, enquanto aquelas oriundas de supermercados estavam embaladas em bandejas de polímero expandido com filme plástico, em ambiente climatizado. Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, identificadas, embaladas em caixas de papelão e transportadas, por via aérea, no mesmo dia da coleta, para os laboratórios de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal e de Análises Químicas de Alimentos, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense, em Niterói, Rio de Janeiro.

Os procedimentos analíticos físico-químicos foram realizados, em duplicata, de acordo com os métodos analíticos oficiais descritos pelo Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA<sup>14</sup>. Foram determinados: Umidade e Voláteis a 105 °C, Resíduo Mineral Fixo em mufla a 550 °C, Cloretos pelo método argentométrico (MÖHR) e Ranço Oxidativo (prova de Kreiss). A Atividade de Água (Aa) foi realizada no aparelho “Pawkit” (Decagon Devices, Inc., USA).

As análises microbiológicas foram realizadas, em duplicata, segundo a Instrução Normativa nº 62, que estabelece os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água<sup>15</sup>. Para estes procedimentos foram obtidas duas subamostras de 25 gramas, sendo uma homogeneizada em solução salina peptonada (SSP) a 0,1 % e outra em água peptonada tamponada (para *Salmonella* spp.), em homogeneizador peristáltico (Seward®), velocidade normal, durante 60 segundos.

Após os preparos das diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> em SSP 0,1 % foram realizadas as seguintes análises: contagens de bolores e leveduras (em ágar batata

dextrose, acidificado com ácido tartárico a 10 % até pH 3,5) e de *Staphylococcus* coagulase positiva (em ágar Baird Parker) incubados a 30 °C por 7 dias e 37 °C por 48 horas, respectivamente. A partir de colônias típicas de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram realizados esfregaços para coloração de Gram, a fim de confirmar as características morfofotintoriais das mesmas (cocos Gram positivos) e para fazer os testes de coagulase e catalase.

A determinação do Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes (CTer) foi realizada pela técnica de miniaturização, segundo metodologia descrita no Merck<sup>16</sup>. Semeou-se 100 µL de cada diluição em SSP 0,1 %, em microtubos tipo “ependorfs”, em triplicata, contendo 1000 µL de caldo Fluorocult® e incubou-se a 37 °C por 48 horas. Foram considerados positivos aqueles microtubos cuja virada de cor do meio apresentaram-se azul e com fluorescência sob luz ultravioleta a 366 nm.

O NMP de *Enterococcus* spp. foi realizada pela técnica de miniaturização, segundo metodologia descrita no Merck<sup>17</sup>. Semeou-se 100 µL de cada diluição em SSP 0,1 %, em microtubos tipo “ependorfs”, em triplicata, contendo 1000 µL de Chromocult® Enterococci Broth e incubou-se a 46 °C por 48 horas. Foram considerados positivos aqueles microtubos cuja virada de cor do meio apresentaram-se azul e no esfregaço pelo método de Gram foram encontrados cocos Gram positivos.

As séries de microtubos positivas foram calculadas através da tabela do NMP (Tabela de McCrady). Ao considerar-se a técnica miniaturizada e pelo fator de diluição intermediária, o resultado final para obtenção do NMP/g foi multiplicado por 10 e, em seguida, dividido por 100.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., após homogeneização em água peptonada tamponada, as amostras foram incubadas a 37 °C por 24 horas para obter o enriquecimento não seletivo. O mesmo foi realizado em caldo selenito cistina e Rappaport Vassiliadis, incubados a 37 °C e 41 °C por 24 horas, respectivamente. Para o isolamento seletivo e observação das características morfo-colônias, foi utilizado os meios cromogênico ágar Rambach® (Merck® nº 7500), ágar Xilose Lisina Descarboxilase (XLD) e ágar “Brilhant-green Phenol-red Lactose Sacarose” (BPLS), todos incubados a 37°C por 24 horas. UFC típicas de cada ágar foram repicadas em: inclinado “Triple Sugar Iron” (TSI) e “Lisina Iron Agar” (LIA), incubados a 37 °C por 24 horas. Das UFC com reações típicas na bioquímica preliminar (ágar TSI e LIA) realizou-se a sorologia com soro somático polivalente O<sup>15</sup>.

Executou-se a estatística descritiva (média aritmética, desvio padrão, valor mínimo e máximo) dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estudados, no programa Excel. Todos os resultados foram comparados com os valores legais de referência vigentes no Brasil para pescado salgado seco<sup>6,18</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas do camarão aviú e da farinha de peixe piracuí estão demonstrados na Tabela 1.

No Brasil, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) é o documento oficial que estabelece padrões físico-químicos para pescado salgado-seco, com teores de umidade de até 35 % e de cinzas de até 25 %<sup>6</sup>. Ao considerar-se que os alimentos analisados nesse estudo caracterizam-se como produtos derivados da pesca salgado-seco, pode-se inferir que os resultados encontrados, em média, atenderam ao RIISPOA quanto ao teor de umidade e cinzas. Entretanto, 30,77 % (4/13) e 7,14 % (1/14) das amostras de aviú e piracuí, respectivamente, excederam o limite máximo permitido para cinzas, provavelmente devido ao processo artesanal de salga que podem gerar produtos com padrões tecnológicos e físico-químicos desuniformes e sem qualidade.

Os teores de umidade encontrados nos diferentes alimentos estudados demonstraram que, no comércio de pescado salgado seco na cidade de Belém, existe uma grande variação nas concentrações deste parâmetro químico, possibilitando a comercialização de produtos da pesca com níveis de qualidade distintos.

Resultados próximos aos obtidos nesse estudo foram descritos em amostras de farinha de peixe piracuí comercializadas na cidade de Manaus, com teores médios de 19,40 % e 12,50 %, respectivamente, para umidade e cinzas<sup>11</sup>, e na cidade de Belém, com 18,86 % para umidade<sup>12</sup>.

Na legislação brasileira foi proposto o limite mínimo de 10 % de cloretos, somente para peixe salgado e peixe salgado seco; no entanto, este regulamento não foi publicado no Diário Oficial. Deste modo, no Brasil, não existe um padrão legal para regulamentar o teor de sal que deve ser utilizado nos produtos derivados da pesca salgado seco.

Por outro lado, o *Codex Alimentarius* estabeleceu que os teores de sal em peixes salgados secos não devem ser inferiores a 12 %<sup>19</sup>. Sendo assim, ao considerar-se

**Tabela 1.** Médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos das análises físico-químicas em amostras de camarão salgado seco Aviú e farinha de peixe Piracuí

Análises	Amostras			
	Aviú (n = 13)		Piracuí (n = 14)	
Umidade (%)	24,00 ±2,38 <sup>a</sup>	(19,83 - 27,37) <sup>b</sup>	18,76±1,75	(15,27 - 21,10)
Cinzas (%)	22,68 ±3,57	(18,46 - 28,69)	12,91±6,19	(7,19 - 25,10)
Cloretos (%)	15,67 ±4,13	(11,10 - 22,88)	8,20±4,23	(3,52 - 14,90)
Aa	0,61±0,14	(0,40 - 0,75)	0,57±0,13	(0,40 - 0,75)
RO	66,67 % positivos		85,71 % positivos	

n = número de amostras  
Aa = Atividade de água

RO = Ranço Oxidativo  
média ± desvio padrão<sup>a</sup>

(valor mínimo - máximo)<sup>b</sup>

este limite para o teor de sal, constatou-se que somente o camarão aviú, em média, atendeu o padrão legal para o conteúdo de sal (15,67 %); enquanto a farinha de peixe piracuí ficou com um teor médio de 8,20 % de cloreto de sódio, portanto, bem abaixo do valor de referência recomendado, o que pode favorecer a deterioração microbiana e comprometer a qualidade, pois sua comercialização, nas feiras livres, dá-se em temperatura ambiente, sem nenhum tipo de conservação.

É importante ressaltar que, mesmo o camarão aviú tendo apresentado teores de cloretos dentro do padrão legal considerado neste estudo, as quantidades de sal detectadas influenciaram no teor de cinzas excedentes em 30,77 % das amostras, pois os teores de resíduo mineral fixo variaram na proporção dos níveis de sal encontrados na amostragem, uma vez que o cloreto não se decompõe em temperaturas de até 550 °C.

Sobre estes parâmetros de qualidade faz-se necessário apontar que diferentes espécies de pescado e de produtos da pesca podem apresentar diferenças fisiológicas na composição centesimal, entretanto os parâmetros de: umidade, cinzas e cloretos, devem obedecer a um padrão de qualidade para caracterizar o produto como salgado seco, fato relacionado com o processamento tecnológico de salga<sup>20</sup>.

Os valores de Aa encontrados neste estudo variaram de 0,40 a 0,75 que, de acordo com Jay<sup>21</sup>, são considerados alimentos de umidade baixa e estável. Todavia, este parâmetro não é considerado nas diferentes legislações como requisito de qualidade para pescado salgado seco. Lourenço et al<sup>22</sup>, ao estudarem a farinha de piracuí, elaborada com o peixe acari-bodó em condições laboratoriais, detectaram concentrações muito baixas de Aa; entretanto, este parâmetro intrínseco não foi suficiente para impedir o crescimento microbiano do grupo dos microrganismos halofílicos.

As diferenças de Aa encontradas nos dois alimentos pesquisados podem ser atribuídas à inconstância da concentração de sal utilizada em cada

processamento, aos diferentes períodos de estocagem dos produtos e às condições de comercialização.

Não foi encontrado na literatura dados sobre pesquisa de ranço oxidativo em aviú e farinha de peixe piracuí. Porém, neste estudo, foi detectado ranço oxidativo em 74,07 % (20/27) das amostras estudadas. Pode-se inferir que o aumento da oxidação lipídica em produtos salgados possivelmente foi atribuído à presença do sal ou por diferentes perfis de ácidos graxos em cada espécie de pescado estudada. Portanto, estes derivados do pescado salgado-seco comercializados em Belém apresentaram perda de qualidade devido à ocorrência de rancificação.

Em estudos com peixes salgados secos, outros pesquisadores apontaram a presença de ranço oxidativo, em pirarucu salgado seco comercializado na cidade de Belém<sup>23</sup>; assim como em bacalhau comercializado na cidade do Rio de Janeiro<sup>24</sup>. Foi ressaltado que tal alteração lipídica caracteriza um sério risco a saúde coletiva, pois é sabido que os produtos desta degradação têm propriedades citotóxicas<sup>25</sup>.

Os resultados das análises microbiológicas em amostras de aviú e farinha de peixe piracuí estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Das 21 amostras de aviú e farinha de piracuí analisadas para fungos, 100 % apresentaram contaminação, com cálculos que variaram de 1,00 x 10<sup>2</sup> a 1,21 x 10<sup>7</sup> UFC/g. A legislação brasileira não estabelece parâmetros para a contagem de fungos em pescado salgado seco; entretanto, ao considerar outros produtos com condições de Aa similares àquelas encontradas no presente estudo, o padrão aceito para fungos é de 10<sup>4</sup> UFC/g. Foi, portanto, constatado que grande parte das amostras de farinha de peixe piracuí analisadas apresentou níveis de contaminação inaceitáveis para fungos.

Santos e Freitas<sup>12</sup> e Nunes<sup>23</sup> ao avaliarem, respectivamente, a qualidade do piracuí e do pirarucu salgado seco comercializados em Belém, detectaram uma contagem de fungos próxima daquela retratada nesta pesquisa (3,6 x 10<sup>3</sup> a 2,5 x 10<sup>6</sup> UFC/g em piracuí e

**Tabela 2.** Resultados das análises microbiológicas em amostras de camarão salgado seco Aviú

Amostras	Análises				
	Fungos (UFC/g)	SCP (UFC/g)	CTer (NMP/g)	<i>Enterococcus</i> spp. (NMP/g)	<i>Salmomella</i> spp.
1	6,00 x 10 <sup>3</sup>	1,28 x 10 <sup>3</sup>	0	2400	ausência
2	1,00 x 10 <sup>4</sup>	2,49 x 10 <sup>4</sup>	0	230	ausência
3	2,00 x 10 <sup>3</sup>	1,30 x 10 <sup>3</sup>	0	230	presença
4	2,00 x 10 <sup>3</sup>	2,80 x 10 <sup>4</sup>	0	2400	ausência
5	1,00 x 10 <sup>2</sup>	1,00 x 10 <sup>3</sup>	0	>11000	presença
6	3,60 x 10 <sup>3</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	750	ausência
7	5,60 x 10 <sup>3</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	1200	ausência
8	7,00 x 10 <sup>2</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	210	ausência
9	2,50 x 10 <sup>3</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	0	ausência
10	5,60 x 10 <sup>4</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	4	1500	presença
11	-	2,30 x 10 <sup>4</sup>	0	0	ausência
12	-	4,40 x 10 <sup>4</sup>	0	0	ausência
13	-	1,90 x 10 <sup>4</sup>	0	0	ausência
Média	8,85 x 10 <sup>3</sup>	2,07 x 10 <sup>4</sup>	0,31	1532,31	
DP	1,68 x 10 <sup>4</sup>	3,54 x 10 <sup>4</sup>	1,11	2977,68	
Mínimo	1,00 x 10 <sup>2</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	0	
Máximo	5,60 x 10 <sup>4</sup>	1,28 x 10 <sup>5</sup>	4	11000	
PO	--	5 x 10 <sup>2</sup>	100	--	ausência

SCP = *Staphylococcus* Coagulase Positiva  
 - = não realizado  
 CTer = Coliformes Termotolerantes  
 DP = Desvio Padrão  
 PO = Padrão Oficial (BRASIL, 2001)  
 -- = sem padrão oficial

**Tabela 3.** Resultados das análises microbiológicas em amostras de farinha de peixe Piracuí

Amostras	Análises				
	Fungos (UFC/g)	SCP (UFC/g)	CTer (NMP/g)	<i>Enterococcus</i> spp. (NMP/g)	<i>Salmomella</i> spp.
1	5,00 x 10 <sup>2</sup>	2,40 x 10 <sup>4</sup>	0	>11000	ausência
2	3,40 x 10 <sup>5</sup>	>1,04 x 10 <sup>7</sup>	0	>11000	ausência
3	2,00 x 10 <sup>2</sup>	6,00 x 10 <sup>4</sup>	0	230	ausência
4	4,00 x 10 <sup>2</sup>	8,20 x 10 <sup>3</sup>	0	230	ausência
5	8,00 x 10 <sup>4</sup>	3,00 x 10 <sup>2</sup>	0	230	ausência
6	1,40 x 10 <sup>4</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	240	<b>presença</b>
7	2,50 x 10 <sup>5</sup>	1,78 x 10 <sup>6</sup>	0	40	ausência
8	8,68 x 10 <sup>6</sup>	1,66 x 10 <sup>7</sup>	0	0	ausência
9	1,21 x 10 <sup>7</sup>	4,40 x 10 <sup>5</sup>	0	110	ausência
10	2,96 x 10 <sup>5</sup>	3,20 x 10 <sup>4</sup>	0	0	ausência
11	8,00 x 10 <sup>4</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	360	<b>presença</b>
12	-	2,20 x 10 <sup>5</sup>	0	0	ausência
13	-	6,20 x 10 <sup>5</sup>	0	0	ausência
14	-	2,70 x 10 <sup>4</sup>	0	0	ausência
Média	1,99 x 10 <sup>6</sup>	2,16 x 10 <sup>6</sup>	0	1674,29	
DP	4,23 x 10 <sup>6</sup>	4,98 x 10 <sup>6</sup>	0	3952,74	
Mínimo	2,00 x 10 <sup>2</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0	0	
Máximo	1,21 x 10 <sup>7</sup>	1,66 x 10 <sup>7</sup>	0	11000	
PO	--	5 x 10 <sup>2</sup>	100	--	ausência

SCP = *Staphylococcus* Coagulase Positiva  
 - = não realizado  
 CTer = Coliformes Termotolerantes  
 DP = Desvio Padrão  
 PO = Padrão Oficial (BRASIL, 2001)  
 -- = sem padrão oficial

4,00 x 10<sup>2</sup> a 1,20 x 10<sup>7</sup> UFC/g em pirarucu salgado seco); o que reforça as péssimas condições higiênico-sanitárias do comércio de pescados salgados secos, na região Norte do país.

Por outro lado, Lourenço et al<sup>22</sup> detectaram uma contagem de fungos, na farinha de peixe piracuí, inferior ao detectado no presente estudo (3,00 x 10<sup>2</sup> UFC/g), possivelmente porque este produto foi elaborado

em situações favoráveis de laboratório; portanto, em condições de processamento controladas. Enquanto Souza et al<sup>26</sup> encontraram em camarão salgado seco, na cidade de Teresina, contagens de fungos que corroboram com os resultados desta pesquisa (acima de  $10^3$  UFC/g).

É sabido que os fungos são responsáveis pela deterioração de alimentos desidratados quando armazenados em condições inadequadas, e a presença deste microrganismo em alimentos pode tornar-se um perigo à saúde coletiva devido à produção de micotoxinas.

De acordo com o padrão microbiológico oficial estabelecido para pescados salgados secos<sup>18</sup>, no que diz respeito à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), 61,54 % (8/13) e 78,87 % (11/14), respectivamente, das amostras de aviú e piracuí não atenderam ao regulamento em relação à contagem máxima aceita para este grupo microbiano ( $5,00 \times 10^2$  UFC/g). Observaram-se amostras com crescimento fora do padrão que variaram entre  $1,00 \times 10^3$  a  $1,66 \times 10^7$  UFC/g. Possivelmente, esta elevada contaminação pode ser atribuída a uma manipulação inadequada, o que favoreceu a contaminação cruzada por estes microrganismos.

Santos e Freitas<sup>12</sup> encontraram resultados próximos aos obtidos nesta pesquisa para SCP, com contagens entre  $2,2 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^6$  UFC/g, no mesmo alimento e nas mesmas condições de comercialização da cidade de Belém. Entretanto, discordantes daqueles encontrados por Alves<sup>11</sup>, que detectou na farinha de peixe piracuí valores entre  $2,3 \times 10^3$  e  $2,4 \times 10^3$  UFC/g de SCP.

Franco e Landgraf<sup>27</sup> descreveram que os estafilococos constituem o principal grupo microbiano que habita a pele humana, podendo-se inferir que estes agentes possam ter sido transferidos às amostras de aviú e de farinha de peixe piracuí, através do manipulador durante o preparo e comercialização, sendo considerado um perigo potencial à saúde coletiva, em função da possibilidade de produção da enterotoxina estafilocócica.

Todas as amostras de aviú e da farinha de piracuí analisadas atenderam ao padrão oficial para a contagem de coliformes termotolerantes (100 NMP/g), considerando-se o a Legislação Brasileira<sup>18</sup>. Achados estes que estão de acordo com Alves<sup>11</sup>, ao pesquisar coliformes a 45°C em farinha de piracuí, com contagens entre 0,3 a 4,3 NMP/g; por Lourenço et al<sup>22</sup>, que detectaram este tipo de coliformes em contagens menores que  $1,0 \times 10^1$  UFC/g; e por Santos e Freitas<sup>12</sup>, que não detectaram este grupo de enterobactérias neste produto da pesca paraense. Tal resultado pode ser atribuído à ação bacteriostática do sal e a baixa Aa sobre estes microrganismos.

*Enterococcus* spp. foram detectados em 69,23 % (9/13) e 64,28 % (9/14), das amostras de aviú e farinha de peixe piracuí, respectivamente. Na legislação brasileira não há padrão microbiológico para este gênero bacteriano em alimentos; apesar destes agentes serem considerados indicadores de contaminação fecal e possuírem importância no controle de qualidade de alimentos.

Franco e Landgraf<sup>27</sup> afirmaram que *Enterococcus* spp. resistem as condições ambientais adversas e sobrevivem em alimentos dessecados e curados; fato este comprovado por Nunes et al<sup>23</sup> e Pombo et al<sup>28</sup>, ao detectarem esta bactéria em pirarucu salgado seco e em peixes anchovados, respectivamente.

Quanto a pesquisa de *Salmonella* spp. verificou-se que em cinco amostras (18,51 %) foi detectado este patógeno intestinal; o que não atende ao padrão oficial em Brasil<sup>18</sup>. Este resultado corrobora com os achados de Nunes<sup>23,31</sup>, Almeida Filho et al<sup>29</sup> e Leite et al<sup>30</sup> que também detectaram este agente bacteriano, respectivamente, em pirarucu salgado seco, bacalhau e camarão seco. O que demonstra que, em pescado salgado, o desenvolvimento deste agente bacteriano é plenamente possível, apesar de Alves<sup>11</sup>, Santos e Freitas<sup>12</sup> e Lourenço et al<sup>22</sup> não terem encontrado *Salmonella* spp. em amostras de farinha de peixe piracuí.

## CONCLUSÃO

Em decorrência dos resultados encontrados no presente estudo é possível afirmar que o camarão salgado seco aviú e a farinha de peixe piracuí estão sendo produzidos e comercializados em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias em relação à produção de produtos salgados secos, e que a conservação no comércio da cidade de Belém é precária, acarretando perda de qualidade.

Faz-se necessário estabelecer padrões microbiológicos e físico-químicos para esses alimentos de origem animal a fim de evitar riscos à saúde do consumidor.

## REFERÊNCIAS

1. IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2006. Estatística Pesqueira do Amazonas e do Pará. 2003. Manaus: IBAMA; Pró-Várzea. 76 p.
2. Silva CR. O pescado como alimento. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 1981. 15 p.
3. Assunção ASA. Composição centesimal, colesterol e maturação ovariana do *Acetes marinus* OMORI, 1975 coletado no baixo Tocantins [dissertação de mestrado]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2007.
4. Chiou WD, Cheng LZ, Chen CT. Effects of lunar phases habitat depth on vertical migration patterns of the sergestid shrimp *Acetes intermedius*. *Fish Sci*. 2003;69:277-87.

5. Sampaio GR. Ocorrência de óxidos de colesterol e análise do perfil lipídico em camarão salgado-seco [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Decreto nº 3.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 de junho de 1962, 1236 de 02 de setembro 1994, 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e 2.244 de 04 de junho de 1997. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), Brasília, DF, 1997. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 05 jun. 1997, Seção 1.
7. Castro FCP. Concentrado proteico de peixe como suplemento alimentar nas forças armadas: emprego, produção e estabilidade de concentrado proteico de piracuí na ração operacional de combate de selva. Workshop Brasileiro em Aproveitamento de Sub-Produtos do Pescado; 2003; Itajaí-Santa Catarina: Cd-rom (Anais).
8. Miller RP, Nair PKR. Indigenous agroforestry systems in Amazonia from prehistory to today. *Agroforest Syst*. 2006;66(1):151-64.
9. Almeida JC. Avaliação econômica da produção de concentrado proteico de peixe da Amazônia (Piracuí). [tese de doutorado]. Manaus (AM): Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA); 2009.
10. Sá Filho JC. Comparação da composição química do piracuí vendido no mercado do Ver-o-peso e em um ponto comercial pré-determinado do município de Belém – Pará. [monografia de especialização]. Belém (PA): Faculdade de Ciências Agrárias do Pará; 1998.
11. Alves DCR. Qualidade do “Piracuí” comercializado na cidade de Manaus – AM. [monografia de Trabalho de Conclusão de Curso]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas, Manaus; 2009.
12. Santos JRC, Freitas, JA. Características e qualidade de um produto derivado de peixe denominado “Piracuí”. *Rev Ciênc Agrar*. 2004;41:47-56.
13. Guimarães MCF, Oliveira MLS, Ferreira FAM. Caracterização química e microbiológica da farinha de peixe piracuí. VI Encontro de Profissionais de Química da Amazônia; 1988; Manaus: Resumo de Encontro. p. 50-7.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 01 de 07 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 out. 1981. Seção 1, p. 19381.
15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, Brasília, 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1. p. 14.
16. Merck, 2002a, modificado por: Franco, RM, Mantilla SPS. *Escherichia coli* em cortes de carne bovina (acém): avaliação de metodologia e sensibilidade de antimicrobianos aos sorovares predominantes. 14º Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia; novembro de 2004; Niterói-Rio de Janeiro. 1º Lugar na área de Ciências Agrárias (em CD).
17. Merck, 2002b, modificado por: Franco RM, Leite AMO. Enumeração e identificação de *Enterococcus* spp. e cepas de *Escherichia coli* patogênico em coxas de frango e estudo de atividade antimicrobiana das cepas isoladas. 15º Seminário de Iniciação Científica e Premio UFF Vasconcelos Torres de Ciência e Tecnologia; novembro de 2005, Niterói-Rio de Janeiro. Classificado entre os melhores trabalhos científicos da área de Ciências agrárias (em CD).
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, 2001. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 set. 2001, Seção 1. p. 60.
19. Codex Alimentarius. Codex Standard for Salted Fish and Dried Salted Fish of the Gadidae Family of Fishes. Codex Stan 167. 1989. 10 p.
20. Brás A, Costa R. Influence of brine salting prior to pickle salting in the manufacturing of various salted-dried fish species. *J Food Eng*. 2010;100:490-5.
21. Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto alegre: Artmed; 2005.
22. Lourenço LFH, Santos DC, Ribeiro SCA, Almeida H, Araújo EAF. Study of adsorption isotherm and microbiological quality of fish meal type “piracuí” of Acari-Bodo (*Liposarcus pardalis*, Castelnau, 1855). *Procedia Food Sci*. 2011;1:455-62.
23. Nunes, ESCL. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do pirarucu (*Arapaima gigas* Schinz, 1822) salgado seco comercializado na cidade de Belém, Pará. [tese de doutorado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2011.
24. Mársico ET, Silva C, Barreira VB, Mantilla SPS, Moraes IA. Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):406-10.
25. Kraemer FB. Análise micológica e determinação físico-química de amostras de camarão salgado seco comercializados no estado do Rio de Janeiro. [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2000.
26. Souza AWB, Cardoso Filho FCC, Lima VBS, Carneiro RM, Paixão IO, Muratori MCS. Fungos em camarão salgados-secos comercializados no mercado de Teresina, estado do Piauí. *Rev Hig Alim*. 2011;25(194/195):1007-9.
27. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu; 2008.
28. Pombo CR, Mársico ET, Franco RM, Guimarães CFM, Aguiar NCS, Pardi HS, Oliveira GA. Caracterização físico-química e bacteriológica de peixes anchovados. *R Bras Ci Vet*. 2006;13(3):170-3.
29. Almeida Filho ES, Sgarini CO, Valente AM, Andrade PF, Oliveira LAT, Franco RM, et al. Presença de microrganismos indicadores de condições higiênicas e de patógenos em bacalhau saithe (*Pollacius virens*) salgado seco, comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *R Bras Ci Vet*. 2004;11(3):171-3.
30. Leite CC, Sant’Anna MEB, Assis PN, Mariano APM. Qualidade higiênico-sanitária do acarajé e seus complementos comercializados em diferentes pontos turísticos da cidade de Salvador, BA. *Rev Hig Alim*. 2000;14(71):50-3.
31. Nunes ESCL, Franco RM, Mársico ET, Neves MS. Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas* Shing, 1822) salgado seco comercializado em mercados varejistas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(3):520-9.

# Prevalência de contaminação bacteriana em estetoscópios

## Prevalence of bacteria contamination on stethoscopes

RIALA6/1557

Lauro Gilvan Batista DUTRA<sup>1</sup>, Henrique Borges do Nascimento NETO<sup>1</sup>, Fúlvio Borges NEDEL<sup>2</sup>,  
Eduardo Alexis LOBO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC. Av. Independência, 2293, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. CEP: 96815-900. E-mail: lobo@unisc.br. Tel.: (51)3717-7519.

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Saúde (CCS). Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Universidade Federal de Santa Catarina

Recebido: 11.11.2012 - Aceito para publicação: 30.06.2013

### RESUMO

O estetoscópio é um dos instrumentos mais utilizados por médicos e enfermeiros para realizar exame clínico de pacientes e esse aparelho pode atuar como veículo de transmissão de micro-organismos. Neste trabalho, foi avaliada a prevalência da contaminação bacteriana em estetoscópios utilizados em diferentes unidades de saúde em Santa Cruz do Sul - RS, nas práticas de limpeza utilizadas pelos usuários, bem como o grau de informação dos profissionais sobre os procedimentos de limpeza. Foi realizado estudo observacional, transversal e analítico em 2011, foram analisados 81 estetoscópios usados em unidades básicas de saúde e unidades de terapia intensiva, pediátricos e adultos, e um questionário foi aplicado. Dos 81 estetoscópios, 96,2 % estavam contaminados e *Staphylococcus aureus* foi o micro-organismo mais frequentemente detectado; 55,2 % dos profissionais afirmaram que realizam a desinfecção de estetoscópios, sendo 58,8 % médicos e 52,3 % profissionais de enfermagem. Ademais, 85,7 % dos funcionários da enfermagem e 64,7 % dos médicos afirmaram que não receberam orientação por parte de instituições em que trabalham sobre os procedimentos para a limpeza dos estetoscópios. A significativa prevalência de contaminação bacteriana detectada nos estetoscópios analisados (96,2 %) demonstra a existência de risco potencial de contaminação cruzada de infecções nosocomiais.

**Palavras-chave.** estetoscópio, contaminação biológica, infecções nosocomiais, atenção primária de saúde, unidades de cuidados intensivos, profissionais da saúde.

### ABSTRACT

The stethoscope is widely used by doctors and health professionals for clinical examination of patients, and this medical device can act as vehicle for transmitting microorganisms from a patient to another. Thus, the present study evaluated the prevalence of bacterial contamination on stethoscopes used in different health units in Santa Cruz do Sul, RS; the stethoscopes cleaning practices utilized by users; the degree of information of health professional on the cleaning and disinfection procedures. An observational cross-sectional and analytical study was conducted in 2011, analyzing 81 stethoscopes used by professionals in the pediatric and adult primary care units and intensive care units, and a specific questionnaire was applied. Of 81 stethoscopes, 96.2 % were contaminated, and *Staphylococcus aureus* was the most frequently found microorganism; and 55.2 % of professionals stated that they do the disinfection of the stethoscopes, being 58.8 % physicians and 52.3 % nursing professionals. Besides, 85.7 % of nurses and 64.7 % of physicians stated that they had not received any guidance on the stethoscopes cleaning and sterilization procedures from the institution where they work. The significant prevalence of bacterial contamination detected in the analyzed stethoscopes (96.2 %) demonstrates the occurrence of a potential risk of transmission of nosocomial infections.

**Keywords.** stethoscope, biological contamination, nosocomial infections, primary health care, intensive care units, health professionals/health care providers.

## INTRODUÇÃO

O estetoscópio é um instrumento que é usado de modo rotineiro, principalmente por médicos e enfermeiros, que entra em contato direto com muitos pacientes e, portanto, pode servir como vetor na disseminação de infecções pela transferência de micro-organismos entre pacientes por intermédio dos profissionais de saúde<sup>1</sup>. É, de fato, um dos instrumentos de auxílio diagnóstico mais usado por médicos e enfermeiros em ambientes de atendimento em saúde, no entanto, pouca atenção tem sido dispensada aos cuidados básicos no seu manuseio, principalmente no que se relaciona aos cuidados primários de limpeza e desinfecção<sup>2,3</sup>.

Os micro-organismos envolvidos nas infecções hospitalares ou nosocomiais são frequentemente transmitidos a partir do ambiente ou de paciente para paciente, por meio dos profissionais de saúde. Mais recentemente, o termo “infecção adquirida durante os cuidados de saúde” (IACS) foi proposto para abranger as infecções adquiridas nos cuidados e procedimentos de saúde prestados em vários ambientes como o ambulatorial. A partir desse novo conceito, torna-se “importante assegurar a comunicação e a articulação entre as diversas unidades de saúde, para a identificação dessas infecções a fim de reduzir o risco de infecção cruzada”. Cerca de um terço das infecções adquiridas no decurso da prestação de cuidados podem ser evitadas<sup>4</sup>.

A transmissão de infecções por meio de dispositivos médicos contaminados já tem sido demonstrada em instrumentos como termômetros eletrônicos, medidores de pressão arterial, estetoscópios, luvas de látex, máscaras, gravatas, canetas, crachás e jalecos brancos<sup>5</sup>. Pelo menos desde a década de 1990, principalmente a partir dos estudos de Jones e Wriugh<sup>6,7</sup>, pesquisas demonstraram que estetoscópios podem transportar estafilococos. Desse modo, programas de controle de infecção podem ser significativamente eficazes para reduzir as taxas de infecção hospitalar, no entanto, a implantação de tais programas é dificultada pela baixa adesão dos trabalhadores da área da saúde<sup>8</sup>.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de contaminação bacteriana no diafragma dos estetoscópios em diferentes unidades de atendimento de saúde do Município de Santa Cruz do Sul, RS, bem como as práticas de limpeza utilizadas pelos usuários de estetoscópio e o grau de informação dos profissionais da

área da saúde com respeito às recomendações de limpeza desse instrumento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional, transversal e analítico em 2011, coletando amostras microbiológicas do diafragma de 81 unidades de saúde localizadas no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil: Unidade de Tratamento Intensivo adulta (UA), Unidade de Tratamento Intensivo pediátrica (UP) e Pronto Atendimento de Urgência (PA) do Hospital Santa Cruz, Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Arroio Grande (AG), Avenida (AV), Belvedere (BE), Esmeralda (ES), Farroupilha (FA), Senai (SE) e Verena (VE), Estratégias de Saúde da Família (ESF) do Bom Jesus (BJ), Cristal Harmonia (CR), Faxinal (FA), Gaspar Bartholomay (GB), Glória Imigrante (GI), Margarida Aurora (MA), Menino Deus (MD) e Pedreira (PR), Centro Materno Infantil (CE) e Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SA). Médicos, enfermeiros e técnicos de enfermagem, das respectivas unidades, participaram do estudo. A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) e aprovada sob o número nº CAAE 5030.0.000.109-10. Após obter o consentimento informado de cada participante, um questionário anônimo foi administrado para obter informações sobre a desinfecção do estetoscópio, o tipo de higienização e a frequência.

Foram realizadas coletas com o uso de *swab* estéril umedecido em solução fisiológica e inoculada em caldo de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e levado à estufa a 37 °C por 24 a 48 horas. As amostras foram semeadas em meios de Ágar-sangue e MacConkey para o crescimento de micro-organismos. Os procedimentos de microbiologia diagnóstica para caracterização das amostras da pesquisa foram realizados com o uso de técnicas de identificação bacteriana por série bioquímica tradicional. Os micro-organismos foram isolados, avaliando características de colônias e reação de Gram e da realização de testes como da catalase e coagulase, hemólise, fermentação de açúcar e outros testes bioquímicos, incluindo produção de indol, utilização de citrato e atividade da urease, teste por fermentação de sacarose, glicose e lactose, testes de oxidase e do sulfureto de hidrogênio, conforme metodologia padrão microbiológica<sup>9</sup>.

A hipótese trabalhada foi a de que os estetoscópios utilizados nos serviços de saúde do

município apresentaram contaminação bacteriana, constituindo-se em vetores potenciais de transmissão de infecções hospitalares. As variáveis em estudo foram o conhecimento do profissional sobre a higienização dos estetoscópios, a qual grupo pertence o profissional entrevistado; frequência de higienização; tipo de serviço de saúde e o de antisséptico utilizado.

Variáveis categóricas foram apresentadas em números absolutos e porcentagens. As variáveis foram comparadas utilizando o Teste Exato de Fisher<sup>10</sup>. Trabalhou-se com níveis de significância  $\alpha=5\%$ , utilizando o software estatístico SPSS versão 18.0. Ainda realizou-se uma análise de agrupamento tendo como base o método hierárquico aglomerativo de Ward (método da variância mínima) para a identificação de grupos homogêneos, usando como medida de similaridade a distância euclidiana, conforme as recomendações de Hair et al<sup>11</sup>. As análises foram realizadas utilizando o *software* PAST, v. 2.15<sup>12</sup>.

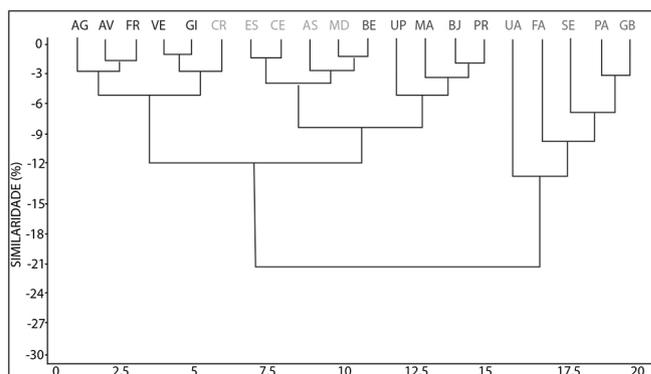
## RESULTADOS

Foram avaliados 81 estetoscópios: 9 da UTI adulto, 8 da UTI pediátrica, 13 das unidades de Pronto Atendimento adulto e pediátrico, 29 de unidades de Estratégia de Medicina da Família e 22 de Unidades Básicas de Saúde.

Do total de estetoscópios examinados, 17 (21%) foram utilizados por médicos e 64 (79%) sob a responsabilidade da enfermagem. Os resultados indicaram que 78 (96,2%) estetoscópios estavam contaminados, sendo 15 (88,2%) dos médicos e 63 (98,4%) da enfermagem, entretanto a diferença entre os dois grupos profissionais não foi estatisticamente significativa ( $p>0.05$ ). Os três estetoscópios livres de contaminação foram um da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) pediátrica e os demais de uma unidade de Estratégia de Saúde da Família (ESF) e de uma Unidade Básica de Saúde (UBS), ambos pertencentes a médicos que informaram realizar higienização após cada paciente.

A Tabela 1 apresenta os micro-organismos encontrados e sua frequência de ocorrência.

Os resultados da análise de agrupamento da frequência de ocorrência de bactérias contaminantes de estetoscópios utilizados nas distintas unidades de atendimento apresentam-se na Figura 1, destacando a UTI adulta pertencente ao grupo com máxima dissimilaridade, juntamente com as unidades do ESF

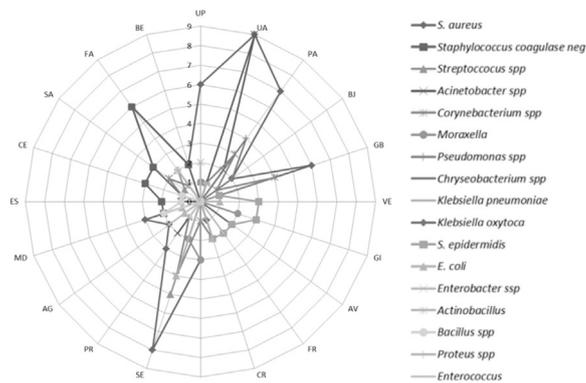


**Figura 1.** Análise de agrupamento da frequência de ocorrência de micro-organismos em estetoscópios utilizados em distintas unidades de atendimento, Município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, utilizando o método hierárquico aglomerativo de Ward (método da variância mínima). UA – Unidade de Tratamento Intensivo adulta; UP – Unidade de Tratamento Intensivo pediátrica; PA – Pronto Atendimento de Urgência; AG – Arroio Grande; AV – Avenida; BE – Belvedere; ES – Esmeralda; FR – Farroupilha; SE – Senai; VE – Verena; BJ – Bom Jesus; CR – Cristal Harmonia; FA – Faxinal; GB – Gaspar Bartholomay; GI – Glória Imigrante; MA – Margarida Aurora; MD – Menino Deus; PR – Pedreira; CE – CEMAI; SA – SAMU

Faxinal, ESF Senai, Pronto Atendimento e UBS Gaspar Bartolomay.

Ao comparar esses dados com o gráfico em teia da Figura 2, observa-se que essas unidades são as que apresentaram um maior número de estetoscópios contaminados e também micro-organismos que ocorreram com maior frequência de contaminação.

Dos 38 entrevistados, 55,2% dos profissionais afirmaram realizar desinfecção dos estetoscópios, destes, 58,8% dos médicos e 52,3% da enfermagem. Sobre a frequência de higienização, 5 (13%) informaram realizar desinfecção após cada paciente, 17,6% dos médicos e 9,5% da enfermagem; 11 (28,9%) diariamente ou



**Figura 2.** Contaminação bacteriana dos estetoscópios nas diferentes unidades de saúde

**Tabela 1.** Micro-organismos isolados

Micro-organismo contaminante	Nº estetoscópios contaminados	Nº estetoscópios médicos	Nº estetoscópios enfermagem	Total(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	63	8	55	77,7
<i>Corynebacterium</i> spp.	21	4	17	25,9
<i>Staphylococcus coagulase neg</i>	18	4	14	22,2
<i>Acinetobacter</i> spp.	14	0	14	17,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	6	7	16,0
<i>Streptococcus</i> spp.	10	1	9	12,3
<i>Moraxella</i> spp.	9	4	5	11,1
<i>Escherichia coli</i>	9	2	7	11,1
<i>Pseudomonas</i> spp.	6	2	4	7,4
<i>Bacillus</i> spp.	6	1	5	7,4
<i>Enterobacter</i> spp.	4	1	3	4,9
<i>Actinobacillus</i> spp.	2	0	2	2,4
<i>Proteus</i> spp.	2	1	1	2,4
<i>Chryseobacterium</i> spp.	1	0	1	1,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	1	1,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0	1,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	1	1,2

semanalmente; 3 (7,8 %) mensalmente e 2 (5,2 %) períodos maiores que um mês.

Em relação ao tipo de antisséptico utilizado, 92 % dos médicos e 77 % da enfermagem responderam utilizar álcool 70 %; outros produtos como água e sabão ou água pura foram apontados por 23 % da enfermagem. Outro dado relevante foi a resposta à questão de, alguma vez, os profissionais terem recebido alguma orientação sobre higienização de estetoscópios pelos seus gestores: 18 (28,1 %) da enfermagem e 11(64,7 %) dos médicos responderam que não.

## DISCUSSÃO

O resultado deste estudo revelou que 96,2 % dos estetoscópios pesquisados estavam contaminados por micro-organismos, o que é comparável com as observações de estudos anteriores que encontraram, respectivamente, 87 %, 89 % e 96 % dos estetoscópios colonizados por distintos micro-organismos<sup>13,14,15</sup>. A implicação dos achados é que o estetoscópio pode ser um meio importante na transmissão potencial de bactérias patogênicas.

A diferença de contaminação dos estetoscópios utilizados por profissionais de enfermagem, que foram os mais contaminados (98,4 %), em relação aqueles utilizados pelos médicos (88,2 %) não foi estatisticamente

significativa ( $p>0,05$ ), resultado também demonstrado em outros estudos como de Uneke et al.<sup>16</sup>. A bactéria que apresentou o percentual de frequência maior foi *S. aureus* (78,0 %). Investigações prévias têm indicado sua ocorrência em 15,8 % a 89 % de estetoscópios estudados<sup>15, 17,18</sup>. A segunda bactéria encontrada com maior frequência foi *Corynebacterium* spp. (26 %), principalmente nas unidades de saúde de Atenção Básica, porém essa bactéria também foi identificada nas unidades hospitalares da UTI adulto (UA) e Pronto Atendimento de urgência (PA). Camello et al<sup>19</sup> identificaram em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro amostras multirresistentes dessa bactéria, enfatizando a possibilidade de processos infecciosos nosocomiais serem ocasionados por *Corynebacterium* spp. Micro-organismos Gram-negativos também têm sido isolados. *Acinetobacter* foi observado em 17 % dos estetoscópios encontrados na unidade de terapia intensiva adulta, serviço de atendimento de urgência e em unidades de atenção primária, incluindo um caso de *Acinetobacter baumannii* em uma unidade de terapia intensiva neonatal<sup>20</sup>. Cabe destacar que o isolamento de micro-organismos Gram-negativos representa um risco real de propagação de infecções potencialmente graves, especialmente no contexto dos serviços de cuidados intensivos, pois bactérias Gram-negativas são importantes causas de

infecções, como as do trato urinário, as intra-abdominais, as pneumonias e septicemias, destacando que o aumento da prevalência de resistência a múltiplas drogas pode ser a maior preocupação para Gram-negativos associados principalmente com infecções hospitalares. Muitos desses isolados resistentes carecem de opções de tratamento e representam um grave problema de saúde pública<sup>20,21</sup>.

A partir da análise de agrupamento da frequência de ocorrência de bactérias, comparada com a distribuição de contaminação bacteriana dos estetoscópios nas unidades de saúde, pode-se inferir que utilização desses dados como forma de orientar a utilização dos materiais e instrumentos pelas unidades – adequando, por exemplo, o número de estetoscópios para a real necessidade do serviço, diminuindo a quantidade excedente e desnecessária para a atividade local – reduz a possibilidade de contaminação e transmissão de micro-organismos. Essa pode ser uma forma efetiva de controle de transmissão vetorial da contaminação, associada à higienização das mãos e dos estetoscópios pelos profissionais de saúde.

A análise do questionário do presente estudo revelou que a contaminação bacteriana esteve relacionada com a frequência de higienização, sendo que os estetoscópios livres de contaminação foram encontrados nos locais em que os profissionais afirmaram realizar higienização após cada paciente utilizando álcool 70 % ou clorexidina. As demais formas de higienização tiveram 100 % de contaminação.

Em particular, todos os estetoscópios que nunca tinham sido limpos revelaram-se contaminados, entretanto, a frequência de limpeza após cada paciente foi associada à menor contaminação ( $p = 0,02$ ). Sendo o estetoscópio um instrumento de auxílio diagnóstico usado na prática diária, há uma necessidade de estratégias para diminuir a sua contaminação bacteriana. Estudos anteriores foram consistentes com os resultados deste estudo, com até 3 % de prestadores da área da saúde limpando regularmente os seus estetoscópios<sup>14,22</sup>. Alguns autores advertem que a desinfecção de instrumentos não críticos, como o estetoscópio, deve fazer parte do conhecimento adquirido na graduação e pós-graduação médica<sup>23, 24</sup>.

Os resultados ainda mostraram que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes tipos de desinfetantes utilizados pelos profissionais de saúde para higienizar seus estetoscópios, destacando que álcool 70 % é o antisséptico mais utilizado como desinfetante,

tendo sido indicado por 92 % dos médicos e 77 % da enfermagem, da mesma forma como em outros estudos<sup>2</sup>. A recomendação da desinfecção dos estetoscópios pelo Ministério da Saúde do Brasil é o uso de álcool etílico a 70 %, que, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, apresenta maior atividade germicida, menor custo e toxicidade do que o isopropílico. Utilizando álcool etílico a 70 %, tem se demonstrado uma redução na contagem de bactérias em torno de 94 % após a higienização do diafragma e olivas de estetoscópios<sup>25</sup>.

## CONCLUSÃO

Foram analisados 81 estetoscópios utilizados pelos profissionais de saúde em Unidades de Atenção Primária e nas Unidades de Tratamento Intensivo pediátrico e adulto, bem como no Pronto Atendimento de um hospital, sendo que 96,2 % dos estetoscópios apresentaram diafragmas contaminados, destacando *Staphylococcus aureus* como o micro-organismo mais frequentemente encontrado. Somente 55,2 % dos profissionais afirmaram realizar desinfecção dos estetoscópios, destacando que 85,7 % da enfermagem e 64,7 % dos médicos responderam que não receberam orientação sobre higienização dos estetoscópios.

Como demonstrado neste estudo, micro-organismos Gram-negativos foram isolados, destacando *Acinetobacter* spp. observado em 17,3 % dos estetoscópios encontrados na unidade de terapia intensiva adulta, serviço de atendimento de urgência e em unidades de atenção primária. Dessa forma, Gram-negativos representam um risco real de propagação de infecções potencialmente graves, especialmente no contexto dos serviços de cuidados intensivos, pois essas bactérias são importantes causas de infecções, destacando que o aumento da prevalência de resistência a múltiplas drogas pode ser a maior preocupação associada principalmente com infecções hospitalares.

Neste contexto, a utilização de estetoscópios sem as devidas formas de prevenção de contaminação pode disseminar as infecções bacterianas e determinar as infecções associadas aos cuidados de saúde. Para isso, é preciso desenvolver programas mais rigorosos e protocolos para a desinfecção de estetoscópio como um padrão de atendimento. A adesão às práticas de desinfecção do estetoscópio por profissionais de saúde irá minimizar a contaminação cruzada e garantir a segurança do paciente.

## REFERÊNCIAS

1. Panhotra BR, Saxena, AK, Al-Mulhim, AS. Contaminated physician's stethoscope – a potential source of transmission of infection in the hospital. Need of frequent disinfection after use. *Saudi Med J*. 2005;26(2):348-50.
2. Sanders S. The stethoscope and cross-infection revisited. *Br J Gen Pract*. 2005;55(510):54-5.
3. Wood MW, Lund RC, Stevenson KB. Bacterial contamination of stethoscopes with antimicrobial diaphragm covers. *Am J Infect Contr*. 2007;35(4):263-6.
4. Portugal. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (PNCI). Lisboa. 2007. [acesso 4 Set 2010]. Disponível em: [http://www.acs.min-saude.pt/pns2011-2016/files/2010/07/PNCI-2007.pdf].
5. Treacle AM, Thom KA, Furuno JP, Strauss SM, Harris AD, Perencevich EN et al. Bacterial contamination of the white coats of the health care workers. *Am J Infect Contr*. 2009;37:101-5.
6. Jones JS, Hoerle D, Riekse R. Stethoscopes: A potential vector of infection? *Ann of Emerg Med*. 1995;26(3):296-9.
7. Wright IMR, Orrt H, Porter C. Stethoscope contamination in the neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 1995;29:65-8.
8. Wenzel R. The economics of nosocomial infections. *J Hosp Infect*. 1995;31:79-87.
9. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto IS. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3ª. ed. São Paulo: Sarvier; 2010.
10. Callegari-Jacques, SM. Bioestatística. Princípios e Aplicações. Porto Alegre: Artmed; 2006.
11. Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. Análise Multivariada de Dados, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.
12. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electr*. 2001;4(1):1-9.
13. Saloojee H, Steenhoff A. The health professional's role in preventing nosocomial infections. *Postgrad Med J*. 2001; 77: 16-9.
14. Xavier MS, Ueno M. Contaminação bacteriana de estetoscópios das unidades de pediatria em um hospital universitário. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(2):217-8.
15. Zuliani Maluf ME, Maldonado AF, Bercial ME, Pedrosa SA. Stethoscope: a friend or an enemy? *São Paulo Med J*. 2002;120(1):13-5.
16. Uneke CJ, Ogbonna A, Oyibo PG, Onu CM. Bacterial contamination of stethoscopes. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(7):436-41.
17. Mitchell A, Dealwis N, Collins J, Chew K, Taylor R, Schwab U et al. Stethoscope or 'Staphoscope'? Infection by auscultation. *J Hosp Infect*. 2010;76(3):278-9.
18. Uneke CJ, Ogbonna A, Oyibo PG, Ekuma U. Bacteriological assessment of stethoscopes used by medical students in Nigeria: implications for nosocomial infection control. *World Health Popul*. 2008;10(4):53-61.
19. Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. *Corynebacterium* spp. isoladas a partir de espécimes clínicos de pacientes de Hospital Universitário, Rio de Janeiro, Brasil. *Braz J Microbiol*. 2003;34(1):39-44.
20. Youngster I, Berkovitch M, Heyman E, Lazarovitch Z, Goldman M. The stethoscope as a vector of infectious diseases in the pediatric division. *Acta Paediatr*. 2008;97(9):1253-5.
21. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *AJIC*. 2006;34(5):20-8.
22. Chau JP, Thompson DR, Lee DT, Twinn S. Infection control practices among hospital health and support workers in Hong Kong. *J Hosp Infect*. 2010;75(4):299-303.
23. Cohen HA, Amir J, Matalon A, Mayan R, Beni S, Barzilai A. Stethoscopes and otoscopes-a potential vector of infection? *Fam Pract*. 1997;14(6):446-9.
24. Madar R, Novakova E, Baska T. The role of non-critical health-care tools in the transmission of nosocomial infections. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106:348-50.
25. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. Processamento de artigos e superfícies em estabelecimentos de saúde. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1994.

## Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana

### Inconsistent results in real-time PCR in analyzing samples from patients with suspected bacterial meningitis

RIALA6/1558

Maristela Marques SALGADO, Maria Gisele GONÇALVES, Fabio Takenori HIGA, Lucila Okuyama FUKASAWA, Priscilla Lima de OLIVEIRA, Carla Naufal da SILVA, Claudio Tavares SACCHI

\*Endereço para correspondência: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP: 01246-000, Cerqueira César, São Paulo – SP, Brasil. Tel.: (11) 3068-2899. E-mail: rede.pcr@gmail.com

Recebido: 14.09.2012 - Aceito para publicação: 26.06.2013

#### RESUMO

O princípio básico para obter resultado confiável é a compatibilidade entre as réplicas e sua reprodutibilidade. Na rotina diagnóstica por PCR em tempo real (PCR-TR), em que centenas de amostras são processadas, a obtenção de resultados com Cts tardios ou réplicas que diferem entre si por mais de três unidades, são inevitáveis. Das 3.000 amostras processadas em 2010, em duplicata, na rotina diagnóstica das meningites bacterianas por PCR-TR na pesquisa de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, 157 (5,2 %), apresentaram inconsistência entre as réplicas (diferença entre Cts maior do que 3) e/ou altos valores de Cts; e os ensaios foram retestados. O presente trabalho investigou estes resultados obtidos, os benefícios destas repetições e as possíveis razões da ocorrência dos resultados discrepantes. Verificou-se que, apenas 18 (11 %) das amostras submetidas à repetição, apresentaram resultados positivos. Erros humanos inerentes à pipetagem, como o uso de pipetas não calibradas, a baixa concentração de DNA alvo nas amostras, a degradação da sonda ou mesmo a possível contaminação aleatória são fatores que contribuem para induzir resultados discrepantes. A realização do ensaio de PCR-TR com amostras em duplicata e a repetição de ensaios com resultados discordantes é um artifício eficiente para avaliar e definir estes resultados.

**Palavras-chave.** reação em cadeia da polimerase em tempo real, meningite bacteriana, diagnóstico laboratorial, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

#### ABSTRACT

The basic principle for obtaining a reliable result is the consistency found among the replicas and its reproducibility. In a diagnostic routine by using real-time PCR (RT-PCR), when hundreds samples are processed, and results with late Cts or replicas that differ by more than three units are inevitable. Of 3,000 samples processed in 2010, in duplicate, in the diagnostic routine of bacterial meningitis by RT-PCR for detecting *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, 157 (5.2 %) samples showed inconsistency among replicas (difference between Cts higher than three units) and/or high Cts values; and the samples were retested. This study assessed these results, the benefits of its repetitions and probable reasons for the occurrence of these discrepant results. Among the retested samples, 18 (11 %) only showed positive results. Human errors inherent to pipetting, use of non-calibrated pipettes, low concentration of target DNA in the analyzed samples, probe degradation or even random contamination are factors which contribute to induce the discrepant results. Performing RT-PCR assay with samples in duplicate and retesting the samples showing discordant results constitute a device for efficiently evaluating and defining these results.

**Keywords.** real-time polymerase chain reaction, bacterial meningitis, laboratory diagnosis, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.

O diagnóstico definitivo das meningites bacterianas, doença meningocócica e pneumonia bacteriana requer o isolamento de *Neisseria meningitidis* (Men), *Haemophilus influenzae* (Hi), *Streptococcus pneumoniae* (Spn) ou outro agente bacteriano de sítios estéreis, tais como: líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, soro, plasma, sangue e tecidos. Entretanto, o número de casos da doença confirmados por cultura é baixo (entre 10 e 30 %), sendo esta baixa positividade decorrente de várias razões, entre elas: as condições inadequadas de cultivo e/ou transporte ou uso de antibióticos previamente à coleta da amostra clínica<sup>1</sup>. O teste de aglutinação do látex e a contraímunoeletroforese não são suficientemente sensíveis para detectar a presença de alvos bacterianos, quando estes se encontram em pequena quantidade nas amostras clínicas<sup>2</sup>. Mesmo a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional pode não ser suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número do DNA alvo.

A PCR em Tempo Real (PCR-TR) é uma modificação da técnica tradicional de PCR que identifica o DNA alvo com maior sensibilidade e especificidade e em menor tempo de reação. A amplificação e a detecção são realizadas simultaneamente em um sistema fechado. Adicionalmente aos iniciadores, o sistema inclui um terceiro oligonucleotídeo na reação, conhecido como sonda. As reações de TaqMan® PCR-TR utilizam sondas lineares de hidrólise que possuem um marcador fluorescente (*reporter*) ligado à parte final 5' e um capturador de fluorescência (*quencher*) unido à parte final 3'. Enquanto estas duas moléculas (*reporter* e *quencher*) estiverem próximas (ligadas à sequência linear de nucleotídeos), a fluorescência do *reporter* será capturada pelo *quencher* e não haverá detecção de sinal pelo aparelho.

A metodologia da TaqMan® PCR-TR é baseada na detecção e quantificação do sinal fluorescente, que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado na reação de PCR. O ciclo de amplificação onde o sinal cruza o *threshold* é chamado de *cycle threshold* ou Ct. Geralmente, suspensões bacterianas ou DNA purificado a partir de amostras de LCR, líquido pleural, soro, plasma, sangue e tecidos provenientes de casos de meningite ou pneumonia bacteriana confirmados por cultura ou com clínica compatível, produzem valores de Ct menores que 39. Valores de Ct maiores ou iguais a 39 são considerados "tardios", podendo ou não ser verdadeiros<sup>3</sup>.

Em nosso laboratório, a PCR-TR para a detecção de Men, Spn e Hi é feita pelo método TaqMan® em formato *triplex*<sup>3</sup>. Neste ensaio, três genes são pesquisados: um específico para Men (*ctrA*), um para Spn (*lytA*) e um para Hi (*bexA*)<sup>4,5,6</sup>. Um gene confirmatório da presença de material genético humano na amostra (gene da RNaseP humana) é pesquisado separadamente em ensaio no formato *single*<sup>7</sup>. O gene *ctrA* está envolvido no processo de transporte da cápsula polissacarídica através da membrana externa de Men. O gene *lytA* é responsável pela produção da autolisina em Spn, enquanto o gene *bexA* codifica a expressão da cápsula polissacarídica em Hi. O gene da RNaseP humana é utilizado para: (i) verificar a qualidade da extração do material genético da amostra (presença de agentes inibitórios) e (ii) confirmar a presença de material humano.

A literatura mostra que não há padrões com relação aos *cut-offs* para a PCR-TR ou critérios definidos para análise de resultados e classificação de amostras como positivas. Alguns pesquisadores estabelecem um valor de Ct como *cut-off* para um determinado ensaio, enquanto outros consideram qualquer sinal de amplificação indicativo de positividade, independentemente do valor do Ct. Alguns pesquisadores testam as amostras em duplicata (réplicas), outros não. Quanto ao número de ciclos, também não há um padrão estabelecido, o qual pode variar entre 40 e 50 ciclos; todavia, a lógica para estas escolhas nem sempre é clara.

Devido à escassez de trabalhos relacionados com a avaliação de réplicas e à falta de consenso no estabelecimento de valores de *cut-off* em ensaios de PCR-TR, este trabalho teve por objetivo avaliar a importância de verificar as reações de PCR-TR em duplicata e de repetir as reações que apresentem altos valores de Ct (Cts tardios), quando realizadas em laboratórios de rotina diagnóstica. Esta prática pode ajudar a garantir confiabilidade nos resultados liberados, além de poder dar indícios de problemas relacionados às pipetagens ou à baixa concentração de DNA alvo nas amostras.

Cálculos matemáticos mostram que, se partirmos de uma única cópia do gene alvo, a curva exponencial de sua amplificação deverá cruzar o *threshold* por volta do ciclo 40 (Ct = 40). Portanto, se considerarmos que uma cópia é teoricamente o limite mínimo de detecção na PCR-TR e que a eficiência da reação foi próxima de 100 % (o dobro a cada ciclo), qualquer Ct acima de 40 seria inválido.

De acordo com nossos dados, amostras com Cts 40/41 possuem grande possibilidade de serem falsos positivos, pois a grande maioria delas, não possui reprodutibilidade e sinais de Cts nesta faixa podem ser artefatos e não uma amplificação real.

Baseado nestes argumentos, usamos em nossa rotina diagnóstica um *cut-off* de 39 (amostras positivas devem possuir valores de  $Ct \leq 39$ )<sup>2</sup>. Resultados com valores de 40 e 41 foram considerados inconclusivos e, dessa forma, foram repetidos. Todos os resultados com valores de Cts iguais a zero ou maior do que 41 nas repetições foram considerados negativos.

Durante o ano de 2010, nosso laboratório processou 3.000 amostras, em duplicata, na rotina diagnóstica das meningites bacterianas por PCR-TR na pesquisa de Men, Spn e Hi. Deste total, 157 (5,2 %) amostras apresentaram inconsistência entre réplicas (diferença entre Cts maior que 3) e/ou altos valores de Cts e foram repetidas. Com a finalidade de investigar estes resultados e os benefícios de suas repetições, estes dados foram extraídos do banco de dados do ano de 2010 e reanalisados. Das 157 amostras, 46 % (n = 72) foram de LCR e 54 % (n = 85) de soro. Com relação ao volume disponível para o exame, 76 % (n = 55) das amostras de LCR e 98 % (n = 83) das de soro, possuíam volumes ideais para processamento. Para facilitar as análises, as amostras foram divididas em 5 diferentes grupos de acordo com os resultados do primeiro ensaio (Tabela).

**Tabela.** Comparação dos resultados do primeiro ensaio e os da repetição entre os 5 grupos de amostras submetidas ao ensaio de PCR-TR *Triplex*

Casos	Grupos					Total
	1	2	3	4	5	
Primeiro ensaio	103	10	36	2	6	157
	66 %	6 %	23 %	1 %	4 %	100 %
Converteram para Positivo	0	0	10	2	6	18
	0 %	0 %	28 %	100 %	100 %	11 %
Converteram para Inc	6	1	8	0	0	15
	6 %	10 %	22 %	0 %	0 %	10 %
Converteram para Negativo	97	9	18	0	0	124
	94 %	90 %	50 %	0 %	0 %	79 %

Grupo 1: Réplicas com o  $Ct1/Ct2 = 0/38, 0/39, 0/40$  ou  $0/41$

Grupo 2: Réplicas consistentes, mas consideradas como resultado inconclusivo ( $Ct1/Ct2 = 40/40, 40/41, 41/41$ )

Grupo 3: Réplicas consistentes, mas com  $Ct1/Ct2 = 39/37, 39/38, 39/39, 39/40, 39/41$

Grupo 4: Réplicas inconsistentes (diferença entre Cts >3:  $Ct1/Ct2 = 18/25, 32/36$ )

Grupo 5: Réplicas consistentes, mas com  $Ct1/Ct2 = 37/40, 38/38, 38/40, 38/41$

A grande maioria das repetições foram feitas na amostragem do grupo 1 (66 %), em que um Ct da duplicata é igual a zero e o outro é tardio, igual a 38, 39, 40 ou 41. Nenhum dos 5 grupos de repetições estão relacionados a um tipo específico de amostra, LCR ou soro. Das amostras do Grupo 1, nenhuma passou a ser positiva após repetição (Tabela).

Algumas condições podem explicar estes resultados discrepantes. Quanto mais baixa a concentração do DNA alvo na preparação, maior a probabilidade de obter Cts elevados e com duplicatas discordantes. Quando a concentração de DNA na amostra original é elevada, a probabilidade das duas alíquotas apresentarem a mesma quantidade de DNA é maior, resultando em maior grau de concordância. Entretanto, quando a concentração de DNA em solução é muito baixa, em torno de poucos fentogramas, é estatisticamente improvável que as duas alíquotas coletadas simultaneamente possuam a mesma concentração de DNA, apesar de terem os mesmos volumes. Problemas na pipetagem das amostras devido a erros humanos, o uso de pipetas não adequadamente calibradas ou ponteiras inadequadas, também podem contribuir para que resultados discrepantes aconteçam. Entretanto, não podemos deixar de considerar que reações de PCR-TR podem emitir sinais tardios, devido à degradação das sondas. Outro motivo para a obtenção de Cts tardios com duplicatas não compatíveis é a contaminação. Em consequência da alta sensibilidade do ensaio e da facilidade do DNA em estar suspenso no ambiente de trabalho, o uso de condições laboratoriais inadequadas na manipulação de DNA pode contaminar aleatoriamente alguns poços das placas de reação.

Para todos os casos de Cts tardios ou réplicas inconsistentes, a repetição do experimento pode indicar o provável motivo deste resultado inicial não compatível. Nossas análises demonstraram que nenhuma repetição feita para os grupos 1 e 2 (Tabela), apresentou resultado positivo. As razões mais prováveis para isso são: a baixa concentração de DNA alvo na amostra, a degradação da sonda ou, até mesmo, a possível contaminação aleatória. Como o princípio básico de um resultado confiável é a compatibilidade dos resultados entre as duplicatas e sua reprodutibilidade, as repetições são justificáveis.

Os resultados obtidos com as repetições dos casos do Grupo 3 estão relacionados ao Ct de 39, utilizado como *cut-off* para positividade (Tabela).

Este é um Ct considerado tardio e apenas 28 % se mantiveram positivos após repetição. Estes resultados, em conjunto com os obtidos com as amostras do Grupo 2 (Cts 40/41), demonstraram que apenas 6,7 % das 149 amostras submetidas à repetição apresentaram resultado positivo, sugerindo que o *cut-off* utilizado neste ensaio para definir positividade, deveria ser modificado para Cts  $\leq$  38. Cts iguais a 39 passam a ser considerados inconclusivos, e Cts  $\geq$  40 passam a ser considerados negativos.

Os motivos para a inconsistência das réplicas que levaram a repetição do ensaio nas amostras do Grupo 4 estão relacionados a erros humanos na pipetagem, já que os resultados das repetições mostraram Cts compatíveis e positivos.

As repetições das amostras no Grupo 5 foram feitas apenas para confirmar a positividade já que o Ct do ensaio inicial é considerado tardio e próximo do *cut-off*. Os resultados mostraram compatibilidade das réplicas e confirmaram a positividade destas amostras.

Em laboratórios com uma grande rotina diagnóstica por PCR-TR, onde centenas de amostras são processadas, a obtenção de resultados com Cts tardios ou com réplicas que diferem entre si por mais de 3 unidades são inevitáveis. Erros humanos inerentes à pipetagem; uso de pipetas não calibradas e ponteiras inadequadas; e a concentração de DNA alvo nas amostras são fatores que contribuem para a obtenção de resultados duvidosos. A realização do ensaio de PCR-TR com amostras em duplicata e a repetição de ensaios com resultados

discrepantes constitui-se um artifício eficiente para avaliar e definir estes resultados.

## REFERÊNCIAS

1. Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, Carvalho MGS, Azevedo J, Oliveira TQ, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis. *BMC Infect Dis*. 2013;13:26-44.
2. Fukasawa LO, Salgado MM, Marques EGL, Fernandes RMBP, Kemp B, Carvalhanas TR. Validação da técnica de contraímunoeletroforese (CIE) para o diagnóstico laboratorial das meningites causadas por *Neisseria meningitidis* sorogrupos A, B, C e W135. *BEPA*. 2012;9(102):13-20.
3. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE*. 2011;6:1-8.
4. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett GA, Ajello GW, Schmink S, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:320-8.
5. Carvalho MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR detection assays to *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2460-6.
6. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1553-8.
7. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, et al. Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerging Infect Dis*. 2004;10:311-6.

## Intralaboratory assessment of analysts' proficiency for carotenoid analysis using a certified reference material

### Avaliação intralaboratorial do desempenho de analistas na análise de carotenoides utilizando material de referência certificado

RIALA6/1559

Cintia Nanci KOBORI<sup>1\*</sup>, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, Rodovia MG 424, Km47, Caixa Postal 56, CEP 35701-970, Sete Lagoas - MG, Brasil, Tel 31 3697-2029. E-mail: cintia@ufsj.edu.br

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas  
Recebido: 14.11.2012 – Aceito para publicação: 24.06.2013

#### ABSTRACT

Carotenoid analysis is inherently challenging, requiring the analysts' expertise and attention to many details. To guarantee the reliability of carotenoid data generated in our laboratory, aside from method development, optimization and validation, periodic evaluation of the analysts' performance is carried out. This paper reports the results obtained in one of our evaluations, using a certified reference material. Five analysts with varying experience in carotenoid analysis participated. The same liquid chromatograph and standard curves were used, restricting the evaluation to the analysts' performance. The HPLC method consisted of extraction with acetone, partition to petroleum ether, saponification with 10 % methanolic KOH, washing with water, concentrating in a rotary evaporator, drying with nitrogen, dissolving in acetone, separation, identification and quantification. The z-score for each carotenoid was calculated. There was very good agreement in terms of the carotenes and  $\beta$ -cryptoxanthin for the five analysts. For lutein and zeaxanthin, the analyst with little experience in carotenoid analysis obtained lower values, but the z-scores were still satisfactory. One analyst who had experience only with carotene analysis also got lower concentrations for the xanthophylls. This was due to the fact that ethyl ether was not used in partitioning the carotenoids from the extracting solvent to petroleum ether.

**Keywords.** analysts' proficiency, carotenoid analysis, certified reference material, intralaboratory evaluation, accuracy, precision.

#### RESUMO

A análise de carotenoides é um desafio inerente, pois requer experiência e atenção dos analistas para vários detalhes. Para garantir a confiabilidade dos resultados, nosso laboratório faz avaliações periódicas do desempenho do método analítico e dos analistas. Este trabalho apresenta os resultados de uma das avaliações utilizando-se material de referência certificado. Participaram do estudo cinco analistas com diferentes tempos de experiência em análise de carotenoides. Foi utilizado o mesmo cromatógrafo líquido de alta eficiência e a mesma curva analítica para restringir a avaliação apenas ao desempenho do analista. A metodologia consistiu na extração com acetona, partição para éter de petróleo, saponificação com 10 % KOH metanólico, lavagem com água, concentração em roto-evaporador, secagem com nitrogênio, dissolução em acetona, separação, identificação e quantificação. Os z-scores foram calculados para cada carotenoides. Houve boa concordância para carotenos e  $\beta$ -criptoxantina para todos os analistas. Para luteína e zeaxantina, o analista com pouca experiência obteve valores menores, mas os z-scores ainda foram satisfatórios. Um analista com experiência apenas em análise de carotenos também obteve concentrações menores para xantofilas; e esses resultados ocorreram pelo fato de não utilizar éter etílico na partição dos carotenoides do solvente de extração para o éter de petróleo.

**Palavras-chave.** proficiência de analistas, análise de carotenoides, material de referência certificado, avaliação intralaboratorial, precisão, exatidão.

## INTRODUCTION

Carotenoids are among the food constituents of major interest in relation to human health. Aside from the well-known vitamin A activity, other biological activities have been attributed to these compounds such as reduction of the risk of developing certain types of cancer, cardiovascular diseases, macular degeneration and cataract<sup>1-3</sup>. These health-promoting actions are widely attributed to the carotenoid's antioxidant activity, by its ability to sequester singlet oxygen and react with free radicals<sup>4-6</sup>. However, other modes of action have been cited: modulation of carcinogen metabolism, regulation of cell growth, inhibition of cell proliferation, enhancement of cellular differentiation, stimulation of cell-to-cell communication, enhancement of the immune system and photoprotection<sup>1,3,7</sup>.

Due to its role in human health and as natural pigments, the need for accurate qualitative and quantitative data on food carotenoids is widely recognized. Because the carotenoids differ in their health-promoting efficacy and coloring property, separation, conclusive identification and individual quantification are necessary. This analysis is inherently difficult, requiring the analyst's expertise, experience and attention to many details. Thus, aside from representative sampling and method validation, the analyst's proficiency should be verified.

Access to interlaboratory evaluation of method and analyst performance, although the preferred procedure, is very limited. Intralaboratory evaluation is needed and standardized protocols have been established<sup>8</sup>. Method accuracy can be verified in the laboratory by recovery tests, method comparison and analysis of a certified reference material. Spiked analytes do not behave in the same way as the endogenous compound, thus the validity of recovery studies of analytes like carotenoids, which are naturally well protected by membranes and cell walls and can be linked to other components in food samples, is questionable. Obtaining comparable results with methods of differing principles/procedure indicate good reliability of the methods. Analysis of a certified reference material is the preferred procedure for verifying method and analyst capability for obtaining accurate results. The analytical process from extraction to instrumental measurement can be assessed. For carotenoids, two certified reference materials have been developed: Community Bureau of

Reference BCR 485 (freeze-dried mixed vegetables) and NIST SRM 2383 (baby food composite)<sup>9,10</sup>.

To ensure the reliability of carotenoid data generated in our laboratory, aside from method development, optimization and validation, periodic evaluation of the analysts' performance is carried out. This paper reports the results of one of their evaluations, using a certified reference material.

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental

Five analysts, with experience on carotenoid analysis varying from one month to 4 years and one analyst with experience only with carotenes, participated. NIST standard reference material 2383 baby food composite was used. The same HPLC equipment and standard curves were employed so that the evaluation was restricted to the analyst's performance in preparing the extract for HPLC analysis. Analysis was done in triplicate by each analyst.

### Carotenoid analysis

The carotenoids were determined using a method developed and evaluated for leafy vegetables by Kimura and Rodriguez-Amaya<sup>11</sup> and validated using a lyophilized vegetable mix certified reference material by Kimura et al<sup>12</sup>.

About 3 g of the homogeneous SRM was weighed and the sample was ground with acetone and Hyflosupercel with a mortar and pestle. The extract was filtered through a sintered glass funnel. Extraction and filtration were repeated until the residue turned colorless (usually 3 times). The carotenoids were transferred to about 50 mL petroleum ether:ethyl ether (2:1) by partition, in a separatory funnel with the addition of water. Saponification of the extract after partition to petroleum ether:ethyl ether was carried out by adding equal volume of 10 % methanolic KOH and 0.1 % butylated hydroxytoluene to the extract and, after flushing with nitrogen, leaving the stoppered flask in the dark at room temperature overnight (about 16 h)<sup>13</sup>. The saponified extract was then washed five times with water, dried with anhydrous sodium sulfate, concentrated in a rotary evaporator, and brought to dryness under nitrogen. Immediately before injection, the carotenoids were dissolved in 2 mL HPLC grade acetone and filtered through a 0.22 µm PTFE syringe filter; a 10 µL aliquot was injected into the liquid chromatograph. All the necessary

precautions were taken to avoid alterations or losses of the carotenoids (e.g. exclusion of oxygen, protection from light, avoiding high temperature and contact with acids, use of high-purity, peroxide-free solvents, completion of the analysis within the shortest possible time) and other errors during analysis<sup>14</sup>.

The HPLC system consisted of a Waters separation module, model 2690 (Waters Corp., Milford, Mass., U.S.A.), equipped with quaternary pump, autosampler injector, degasser and a photodiode array detector (model 996), controlled by a Millennium workstation (version 2010). Detection was at the wavelengths of maximum absorption (max plot).

The column was monomeric C<sub>18</sub> Spherisorb ODS2, 3 μm, 4.6 x 150 mm. The mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.05 % of triethylamine), methanol and ethyl acetate, used at a flow rate of 0.5 mL/min. A concave gradient (curve 10) was applied from 95:5:0 to 60:20:20 in 20 min, maintaining this proportion until the end of the run. Reequilibration took 15 min.

Identification of the carotenoids was done according to Rodriguez-Amaya<sup>14</sup>, with the combined use of retention time, co-chromatography with standards, and the visible absorption spectra. Quantification was by external standardization. Standards were isolated from roquette leaves (lutein), maize (zeaxanthin), papaya (β-cryptoxanthin), watermelon (lycopene) and carrot (α-carotene and β-carotene) by open column chromatography on MgO:Hyflosupercel (1:1, activated for 4 h at 110 °C) packed to a height of 20 cm in 2.5 cm i.d. x 30 cm glass column<sup>12</sup>. The columns were developed with increasing amounts of ethyl ether and acetone in petroleum ether; the purity of the carotenoid isolates was monitored by HPLC. The mean purity of the standards was 97 % for lutein, 97 % for zeaxanthin, 93 % for β-cryptoxanthin, 96 % for lycopene, 93 % for α-carotene and 96 % for β-carotene. The concentrations of the standard solutions were corrected accordingly.

The standard curves were constructed by the injection in triplicate of standard solutions at five different concentrations. The curves passed through the origin and were linear at the concentration range expected of the samples, the coefficients of correlation obtained being higher than 0.99.

### Calculation of the z-score

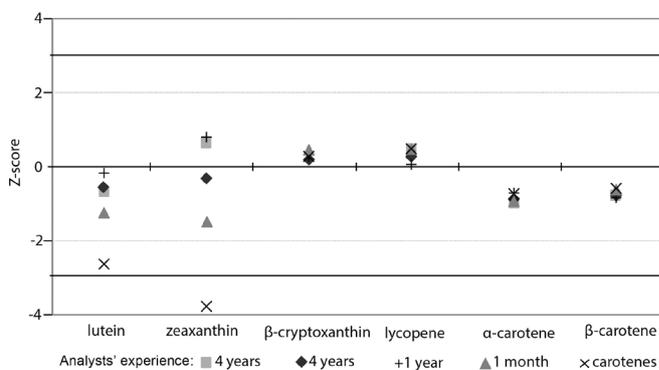
The z-score was calculated for each carotenoid for each analyst, as follows:  $z\text{-score} = (x - \mu) / \sigma$  (with x being

the individual laboratory result, μ the NIST mean value, and σ the NIST standard deviation). This calculation of the z-score is widely used in laboratory proficiency testing programs. A z-score may be either positive or negative, reflecting either a higher or lower result compared to the assigned value. Generally a z-score less than or equal to 2.0 is considered satisfactory, between 2.0 and 3.0 questionable, and greater than 3.0 unsatisfactory<sup>8</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

The chromatogram shows that the HPLC column provided baseline separation of the six carotenoids in the SRM baby food composite. Table 1 presents the carotenoid concentrations obtained by the analysts and the certified or reference values (means and standard deviations) furnished by NIST. It can be observed that all the analysts obtained good values for the carotenes and β-cryptoxanthin. For the xanthophylls, the analyst with little experience and the one who had experience only with carotenes, obtained low values for lutein and zeaxanthin.

Although the concentrations obtained by the analyst with little experience in carotenoid analysis were low for lutein and zeaxanthin, the z-scores were satisfactory ( $z\text{-score} < 2$ ) (Figure 1). The analyst who had experience only with carotenes obtained results which was questionable for lutein ( $2 < z\text{-score} < 3$ ) and was not satisfactory for zeaxanthin ( $z\text{-score} > 3$ ). The other analysts (more than one year of experience in carotenoid analysis) obtained good results for all carotenoids (z-scores less than 1).



**Figure 1.** Z-scores for lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, lycopene, α-carotene and β-carotene. Solid lines indicate ±3.0 z-score and dashed lines indicate ±2.0 z-score

Reevaluating the analytical results of the analyst who had a z-score greater than 3.0, it was discovered

**Table 1.** Means and standard deviations of carotenoid concentrations obtained by the analysts, means and standard deviations of certified or reference values furnished by NIST

Experience of analyst	Carotenoid concentration (mg/g) <sup>a</sup>					
	Lutein	Zeaxanthin	β-Cryptoxanthin	Lycopene	α-Carotene	β-Carotene
4 years	0.94 ± 0.07	0.95 ± 0.02	1.53 ± 0.08	7.70 ± 0.14	0.62 ± 0.02	2.64 ± 0.06
4 years	0.97 ± 0.03	0.83 ± 0.04	1.44 ± 0.01	7.56 ± 0.20	0.64 ± 0.01	2.63 ± 0.06
1 year	1.10 ± 0.06	0.97 ± 0.05	1.48 ± 0.02	7.07 ± 0.27	0.67 ± 0.01	2.59 ± 0.08
1 month	0.72 ± 0.09	0.65 ± 0.06	1.52 ± 0.03	7.70 ± 0.29	0.64 ± 0.00	2.72 ± 0.09
Carotenes only	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.01	1.46 ± 0.03	7.73 ± 0.18	0.67 ± 0.03	2.74 ± 0.12
NIST values	1.16 ± 0.33	0.86 ± 0.14	1.38 ± 0.31	7.00 ± 1.5	0.85 ± 0.24	3.12 ± 0.63

<sup>a</sup> mean ± standard deviation of triplicate analyses

that the low levels were due to the fact that she did not utilize ethyl ether (together with petroleum ether) in the partition step. Petroleum ether is commonly used pure for analysis of carotenes. Ethyl ether makes the ether layer more polar, avoiding the loss of xanthophylls (more polar than the carotenes because of the presence of hydroxyl groups) to the subsequently discarded water phase. The saponification step might have also influenced the results. Necessary to hydrolyze carotenol esters, saponification is error prone and this analyst did not have experience in this step either. Repeating the analysis with the addition of ethyl ether, the results obtained were satisfactory for both lutein and zeaxanthin, the z-scores being less than 2.0, 1.58 for lutein and 1.86 for zeaxanthin.

The importance of experience can also be perceived in terms of precision. The analyst with only one month experience obtained greater standard deviations, particularly in terms of lutein and zeaxanthin, greater than those of the analyst with experience only with carotenes.

Scott et al<sup>15</sup> carried out an interlaboratory study with the participation of 17 European laboratories, using a candidate reference material (lyophilized mixed vegetables). The results indicated that the HPLC systems were not responsible for variations in the analytical data obtained nor was the preparation of the standard solutions a significant problem in the more experienced laboratories. They concluded that the preparation of the extract was the principal factor responsible for the variation of results. This conclusion is reaffirmed in the present study, in which the same HPLC system and standard curves were used by all participating analysts.

Phillips et al<sup>10</sup> reported the results of the USDA's National Food and Nutrient Analysis Program for a total of 2554 values obtained by nine laboratories for 259 certified or reference concentrations of 26 certified reference materials. For carotenoids, more than 20 % of

z-scores were outside ± 3.0, demonstrating the difficulty in measuring these analytes in foods.

## CONCLUSION

The intralaboratory evaluation of the analyst's performance in determining carotenoids, using a certified reference material, reinforced the importance of the preparation of the carotenoid extract for HPLC analysis and demonstrated once again the inherent difficulty of carotenoid analysis. Even with a previously validated method, the experience of the analyst was a decisive factor in obtaining good results. Evaluation of the analysts' performance is fundamental to ensuring the reliability of analytical results.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the participating analysts: Aline Yashima Bombonati, Giovanna Pisanelli Rodrigues de Oliveira, Michelle Andriati Sentanin and Natalia Tawata.

## REFERENCES

1. Olson JA. Carotenoids and human health. *Arch Latinoam Nutr*. 1999;49:7-11.
2. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2004;58:100-10.
3. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*. 2005;26:459-516.
4. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385:20-7.
5. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24:345-51.
6. Kiokias S, Gordon MH. Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Rev Int*. 2004;20:99-121.
7. Stahl W, Ale-Agha N, Polidori MC. Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem*. 2002;383:553-8.

8. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl Chem*. 2006;78:145-96.
9. Sharpless KE, Margolis S, Thomas JB. Determination of vitamins in food-matrix Standard Reference Materials. *J Chromatogr*. 2000; 881:171-81.
10. Phillips KM, Wolf WR, Patterson KY, Sharpless KE, Holden JM. Reference materials to evaluate measurement systems for the nutrient composition of foods: results from USDA's National Food and Nutrient Analysis Program (NFNAP). *Anal Biochem*. 2007;389:219-29.
11. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem*. 2002;78:389-98.
12. Kimura M, Kobori CN, Rodriguez-Amaya DB, Nestel P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chem*. 2007;100:1734-46.
13. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB, Godoy HT. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. *Food Chem*. 1990;35:187-95.
14. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, D. C.: International Life Sciences Institute Press; 1999.
15. Scott KJ, Finglas PM, Seale R, Hart DJ, de Froidmont-Görtz I. Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in foods. *Food Chem*. 1996;57:85-90.

## Avaliação da contaminação microbiana em produtos desinfetantes de uso geral

### Microbial contamination in household disinfectant products

RIALA6/1560

Rodrigo Rollin PINHEIRO<sup>1</sup>, Bruna Peres SABAGH<sup>1</sup>, Livia Maria Rubem VIDAL<sup>2</sup>, João Flávio Carneiro VERAS<sup>2</sup>, Verônica Viana VIEIRA<sup>2</sup>, Aline da Silva Soares SOUTO<sup>3</sup>, Daniela Cristina Rodrigues PEREIRA<sup>1</sup>, Marta de Campos NEVES<sup>1</sup>, Maria Helena Simões VILLAS BOAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Endereço para Correspondência <sup>1</sup>Setor de Saneantes, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av Brasil 4365, 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: 55-21-38655174, +55-21-38655103; fax: +55-21-22900915. E-mail: rodrigorollin@gmail.com.

<sup>2</sup>Setor de Identificação Bacteriana, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>Setor de Fungos de Referência, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido: 11.12.2012 - Aceito para publicação: 11.06.2013

#### RESUMO

Em vista de um estudo desenvolvido no Setor de Saneantes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, referente à avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes, no presente trabalho foram analisados produtos desinfetantes de uso geral disponíveis no mercado brasileiro. Os desinfetantes foram coletados aleatoriamente, dos quais três (produtos A, B e C), apresentaram contaminação microbiana. Para efetuar o isolamento e a identificação dos microrganismos contaminantes foram utilizados o aparelho Vitek<sup>®</sup> 2, a amplificação e o sequenciamento do gene rRNA 16S. A análise realizada por meio de Vitek<sup>®</sup> 2 revelou a presença das bactérias *Serratia marcescens* e *Achromobacter xylosoxidans*, respectivamente, nos produtos A e B. No produto C foram detectadas *Aeromonas salmonicida* pelo Vitek<sup>®</sup> 2 e *Burkholderia lata* pela técnica de amplificação da reação em cadeia da polimerase.

**Palavras-chave.** contaminação microbiana, desinfetantes, controle de qualidade, vigilância sanitária.

#### ABSTRACT

On account of a study developed in Sanitation Sector at the National Institute of Quality Control in Health of Oswaldo Cruz Foundation, concerning the evaluation of antimicrobial activity of disinfectants, the present investigation analyzed disinfectant products of general use which are available in the Brazilian market. Of the disinfectants randomly collected, three of them (products A, B and C) showed microbial contamination. The contaminant microorganisms isolation and identification were performed by using the equipment Vitek<sup>®</sup> 2, and the rRNA 16S amplification and sequencing were done. Vitek<sup>®</sup> 2 analysis revealed the occurrence of *Serratia marcescens* and *Achromobacter xylosoxidans* in the products A and B, respectively. *Aeromonas salmonicida* was detected by Vitek<sup>®</sup> 2, and *Burkholderia lata* was identified by means of amplification technique through polymerase chain reaction in the product C.

**Keywords.** microbial contamination, disinfectants, quality control, sanitary surveillance.

## INTRODUÇÃO

Contaminação microbiana tem sido encontrada em diversos produtos desinfetantes desde a década de 1970, quando as práticas relacionadas ao controle da qualidade do processo de produção ainda eram pouco regulamentadas e distantes dos conceitos atuais. Nos últimos 30 anos, vários relatos na literatura demonstraram a presença de bactérias como contaminantes de produtos desinfetantes, como o isolamento de *Serratia marcescens* em clorexidina<sup>1</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas cepacia* em soluções à base de iodo<sup>2,3</sup>. Particularmente nos produtos desinfetantes constituídos de compostos quaternários de amônio, existem relatos na literatura que demonstraram a presença de diversas espécies bacterianas, contaminando esses tipos de produtos, como *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Alcaligenes xylosoxidans*. Em um desses relatos, pesquisadores de um hospital no Japão estudaram a presença de contaminação microbiana em objetos e soluções utilizados para o processo de lavagem e desinfecção, evidenciando a presença dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*<sup>4</sup>.

A presença de produtos com contaminação microbiana representa um tema de grande importância para saúde pública, uma vez que patógenos presentes nesses produtos podem causar infecções na população. No ambiente hospitalar, já foram descritos casos de surtos de infecções hospitalares causados por contaminação de dispensadores e soluções utilizadas como desinfetantes. Em um desses estudos, foi investigada a causa de um surto de *P. aeruginosa* num hospital na Itália, onde foi observada a contaminação por essa bactéria em dispensadores de sabonetes utilizados nos processos de antissepsia no hospital; foi evidenciada a possível contaminação dessas soluções ou da superfície de contato com as mãos como uma potencial causa de infecções hospitalares<sup>5</sup>. Essa realidade torna-se muito preocupante quando esses patógenos são introduzidos no ambiente domiciliar através da utilização de produtos que teriam como principal função a eliminação dos mesmos. O ambiente domiciliar possui diversas fontes de contaminação microbiana, sendo um dos principais locais de transmissão de doenças infecciosas<sup>6</sup>. Nesses locais, uma série de objetos apresenta contaminação por microrganismos. Ojima e colaboradores estudaram 5 residências no Japão, pesquisando a presença de microrganismos em diferentes superfícies. A cozinha foi

o local com maior contaminação por bactérias aeróbias, seguido pelo banheiro. Coliformes foram encontrados na geladeira, mais precisamente, no compartimento onde são estocados os vegetais. *Escherichia coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram detectadas em diversas superfícies, como: torneiras, pias, esponjas, toalhas de prato e mão, maçanetas, brinquedos, dentre outros<sup>7</sup>. Também já foi demonstrada a presença de contaminação em locais de livre circulação, como: *shoppings*, aeroportos, corrimão de escadas, banheiros públicos, pontos de ônibus, telefones públicos e locais de recreação infantil<sup>8</sup>. Nesse contexto, a utilização de produtos desinfetantes no controle da presença de microrganismos nesses ambientes se torna uma importante ferramenta na prevenção de doenças infecciosas desde que livres de contaminação. Dessa forma, a comercialização de desinfetantes com infecção microbiana coloca em risco diretamente a saúde da população.

Assim, a identificação dos microrganismos envolvidos na contaminação dos produtos se mostra um recurso de grande utilidade para auxiliar no monitoramento da fonte de contaminação durante o processo de fabricação, uma vez que as características dos microrganismos envolvidos podem indicar a porta de entrada destes na linha de produção industrial, além de alertar a população em geral sobre o potencial risco na utilização de produtos desinfetantes contaminados. Existem diferentes técnicas disponíveis para a identificação de amostras microbianas. A realização de provas bioquímicas para a observação do perfil fenotípico é uma ferramenta recorrente e, nesse contexto, existem alguns equipamentos de identificação microbiana que são capazes de otimizar essa avaliação. Com o avanço tecnológico, foram também desenvolvidas técnicas moleculares para a avaliação do perfil genotípico das amostras, possibilitando a identificação de microrganismos através da amplificação de genes pela reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) e posterior sequenciamento dos amplicons. Assim, diferentes ferramentas são utilizadas, levando a maior precisão de identificação e melhor monitoramento do processo de fabricação com o intuito de gerar produtos de qualidade, que não coloquem em risco a saúde dos consumidores<sup>9</sup>.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi o reconhecimento dos contaminantes presentes em três produtos desinfetantes à base de compostos quaternários de amônio adquiridos no mercado brasileiro. Esses

produtos faziam parte de um estudo que o Setor de Saneantes do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz estava realizando, envolvendo a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos desinfetantes de uso domiciliar e institucional.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nesse trabalho três produtos à base de quaternários de amônio dispostos à venda no mercado brasileiro (produtos A, B e C). A avaliação do teor de princípio ativo dos produtos foi realizada pelo Setor de Saneantes e Cosméticos do Departamento de Química do INCQS, de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.014<sup>10</sup>.

Para verificação da presença de contaminação microbiana, foi realizada a inoculação de alíquotas de 1 mL retiradas diretamente da embalagem dos produtos em 10 mL de caldo Lethen, esses tubos foram incubados por 7 dias a 37 °C. A partir destes tubos apresentando crescimento microbiano, foram realizados o isolamento do crescimento, através da semeadura por esgotamento nos meios de cultura *Trypticase Soy Agar* (TSA), *Ágar Cetrimida* e *Ágar Lovestein-Jensen*, e a bacterioscopia das culturas pelo método de coloração de Gram para a verificação das características morfológicas desses contaminantes. A identificação das bactérias contaminantes foi realizada utilizando-se o equipamento Vitek® 2 (*bioMérieux*), que realiza uma série de provas bioquímicas a partir da cultura isolada das amostras. Alçadas do microrganismo isolado foram retiradas para a obtenção de uma suspensão 0,5 em escala *MacFarland* e em solução salina 0,85 %. A suspensão foi utilizada no aparelho em um cartão de identificação (Cartão Vitek 2 GN, nº lote: 241188540) relativo ao Gram confirmado pela bacterioscopia.

Além disso, foi realizada a extração do DNA, pela fervura e posterior congelamento de alíquotas do crescimento microbiano das amostras isoladas em meio TSA. Após a etapa de extração de DNA, foi realizada a PCR para a amplificação do gene rRNA 16S, descrito por Watts e colaboradores<sup>9</sup>. Para a amostra contaminante dos produtos A e B, a PCR foi realizada nas seguintes condições: 10 µL de tampão TE (1x), 1 µL de magnésio (2 mM), 2 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de cada primer (50 ng), 0,5 µL de Taq polimerase, 1,5 µL do DNA da amostra do produto A, 1 µL do DNA da amostra do produto B,

e água (para 50 µL). A ciclagem da reação foi realizada nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 94 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos (esses três últimos passos foram realizados por 30 ciclos); 72 °C por 7 minutos; e 4 °C sem tempo determinado. Para a amostra contaminante do produto C, a PCR foi executada nas seguintes condições: 10 µL de tampão TE (1x), 3 µL de magnésio (3 mM), 2 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de cada primer (50 ng), 0,5 µL de Taq polimerase, 4 µL do DNA da amostra e água (para 50 µL). A ciclagem da reação foi feita nas seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos (esses três últimos passos foram realizados por 35 ciclos); 72 °C por 7 minutos; e 4 °C sem tempo determinado.

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados com o kit *Pure Link PCR Purification* (Invitrogen). Foram adicionados 172 µL de tampão de ligação a 40 µL do amplificado do produto C e 50 µL do amplificado dos produtos A e B, em tubos do kit contendo resina de purificação. Após centrifugação a 11.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 650 µL de tampão de lavagem. Após duas centrifugações a 11.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µL de tampão de eluição, o qual ficou no tubo a temperatura ambiente por 50 minutos. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado a 11.000 rpm por 1 minuto e, posteriormente, a resina foi descartada e o sobrenadante foi guardado em refrigerador a -4 °C.

Os produtos de PCR purificados foram utilizados como molde de DNA para a reação de sequenciamento de suas duas fitas com o sistema comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), conforme as recomendações do fabricante. Após a etapa de sequenciamento, as sequências nucleotídicas foram analisadas, editadas e comparadas a sequências depositada no *GenBank*.

## RESULTADOS

A análise química do teor dos produtos revelou que os três desinfetantes utilizados no trabalho estavam fora dos padrões em relação ao teor do princípio ativo, apresentando 24 %, 20 % e 68 % acima do declarado pelos fabricantes nos produtos A, B e C, respectivamente.

A avaliação da bacterioscopia das amostras revelou a presença de bastonetes Gram-negativos como contaminantes de todos os três produtos. Através

da utilização do equipamento Vitek® 2, foi revelada a presença de *Serratia marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans* e *Aeromonas salmonicida* nos produtos A, B e C, respectivamente, todas com 99 % de probabilidade (Tabela). No sequenciamento do gene rRNA 16S das amostras, foi revelada a presença de *Serratia marcescens* com 99,79 % de homologia, *Achromobacter insolitus* com 98,73 % de homologia e *Burkholderia lata* com 99,93 % de homologia nos produtos A, B e C, respectivamente (Tabela). A amplificação de outros genes é necessária para a exata identificação das espécies.

**Tabela.** Bactérias encontradas como contaminantes dos produtos A, B e C identificadas através do Vitek® 2 e do sequenciamento do gene rRNA 16S

Produtos	Vitek® 2	Sequenciamento gene rRNA 16S
A	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> (99,79 %)
B	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Achromobacter insolitus</i> (98,73 %)
C	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Burkholderia lata</i> (99,93 %)

## DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho permitiram observar a existência de contaminação microbiana em produtos desinfetantes dispostos à venda no mercado brasileiro nos dias atuais, corroborando com dados da literatura que mostram a ocorrência desse tipo de desvio de qualidade desde a década de 1970<sup>4</sup>. Essas observações chamam a atenção para um sério problema de saúde pública, uma vez que esses produtos, ao invés de estarem eliminando os microrganismos e garantindo a saúde da população, estão, na verdade, introduzindo bactérias e, possivelmente, patógenos em residências, ambientes de atendimento à saúde e em indústrias, gerando um grave risco à saúde de toda a população. A maior tolerância dessas bactérias encontradas como contaminantes de produtos desinfetantes parece estar relacionada a uma adaptação fisiológica em resposta a mudança no ambiente, principalmente com alterações na membrana externa das células. Em *P. aeruginosa*, observou-se que há uma diferença na composição do lipopolissacarídeo (LPS) e aumento no conteúdo do íon Mg<sup>+</sup>, que fortalece as ligações entre os LPS. Além da presença de porinas de baixa eficiência que impedem a difusão de moléculas para o interior da célula. Em *B. cepacia*, o alto conteúdo de arabinose ligado ao fosfato no seu LPS parece diminuir a afinidade da membrana externa em relação às moléculas

catiônicas<sup>11</sup>. Nesse contexto, a introdução de bactérias com maior tolerância a esses produtos nos ambientes domiciliar e hospitalar torna ainda mais preocupante a ocorrência de surtos causados por essas bactérias, uma vez que elas podem possuir um maior perfil de tolerância a agentes antimicrobianos, podendo causar infecções que necessitem de controle e tratamentos mais complexos.

Apesar da grande importância desse assunto para a saúde pública, são encontrados poucos relatos na literatura de produtos contaminados sendo comercializados no mercado brasileiro, principalmente no âmbito domiciliar. Nossos dados representam uma das poucas demonstrações de contaminação encontrada diretamente da embalagem de produtos desinfetantes de uso geral, uma vez que a maioria dos trabalhos da literatura relata casos de contaminação de produtos no ambiente hospitalar.

Além da presença de contaminantes nas formulações dos produtos, foi observado o desvio de qualidade em relação à análise química do teor de princípio ativo, indicando que atualmente, apesar da alta tecnologia, processos de fabricação padronizados e rastreados, e um rígido sistema de controle de qualidade, ainda assim é possível encontrar falhas no processo de fabricação, gerando desvios na qualidade dos produtos industriais. Esses dados indicam a necessidade de haver um intenso controle, por parte das próprias empresas, de todas as etapas do processo de fabricação, além da avaliação de todos os lotes de produto final. Além disso, apesar da legislação brasileira não prever a avaliação da presença de possíveis contaminantes, se faz necessária também, uma severa fiscalização pelos órgãos responsáveis para que não cheguem ao mercado produtos com desvios de qualidade que possam gerar risco à saúde<sup>12</sup>.

Dessa forma, no âmbito das indústrias, fazer uso da identificação dos microrganismos presentes como contaminantes em cada etapa do processo de fabricação é uma ferramenta muito útil para monitorar os principais pontos críticos da linha de produção. Além disso, o conhecimento das espécies microbianas envolvidas com as contaminações do processo de fabricação ajuda a identificação da porta de entrada desse contágio, por meio da avaliação das características e comportamento dos microrganismos em questão, associando-os a fonte de contaminação que podem ser a água, matéria-prima e, até mesmo, o ambiente fabril. No âmbito dos órgãos

de fiscalização, a identificação desses microrganismos auxilia o rastreamento de surtos possivelmente causados por essas contaminações, além de permitir uma avaliação mais completa dos produtos.

Esse trabalho permitiu identificar os contaminantes de produtos desinfetantes por duas abordagens diferentes: uma, por meio de uma série de provas bioquímicas realizadas pelo equipamento Vitek® 2; outra, através da amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S, importante gene utilizado para a identificação de microrganismos. Para os produtos A e B, as duas abordagens apresentaram resultados muito semelhantes, entretanto para o produto C, a identificação microbiana se apresentou diferente, indicando que a identificação baseada em provas bioquímicas nem sempre corrobora com a apoiada em estudos moleculares. Por isso, para uma identificação mais precisa das espécies envolvidas na contaminação dos produtos, é necessário o estudo de outros genes conservados capazes de gerar dados para essa distinção.

Assim, a presença de desvios na qualidade dos produtos industrializados que possam resultar em riscos à saúde da população deve ser evitada por meio de um rígido controle dos processos de fabricação, minimizando possíveis falhas e mantendo o produto final seguro para ser comercializado.

## CONCLUSÃO

Esse trabalho permitiu concluir que a identificação de contaminantes em produtos desinfetantes comercializados no mercado brasileiro, indica a presença de desvios na qualidade que podem gerar graves riscos à saúde da população. Com isso, é possível perceber a importância de se ter um rígido sistema de avaliação da qualidade desses produtos, tanto por parte das empresas, como dos órgãos responsáveis pela fiscalização.

Assim, a notificação e atenção voltada para os desvios de qualidade encontrados em produtos desinfetantes presentes no mercado é de extrema importância para a prevenção e redução de riscos à saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), pelo apoio financeiro e estrutural. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro (bolsa mestrado). Agradecemos o Laboratório de Saneantes e Cosméticos do INCQS pelas análises dos produtos saneantes

## REFERÊNCIAS

1. Marrie TJ, Costerton JW. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol*. 1981;42:1093-102.
2. Berkelman RL, Anderson RL, Davis BJ, Highsmith AK, Petersen NJ, Bond WW, et al. Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution: investigation of the implicated manufacturing plant. *Appl Environ Microbiol*. 1984;47:752-6.
3. Anderson RL, Vess RW, Panlilio AL, Favero MF. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56:3598-600.
4. Oie S, Kamiya A. Microbial contamination of antiseptics and disinfectants. *Am J Infect Control*. 1996;24:385-95.
5. Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P, et al. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa*. Hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17064 /journal.pone.0017064.
6. Kagan LJ, Aiello AE, Larson E. The role of the home environment in the transmission of infectious diseases. *J Community Health*. 2002;27:247-64.
7. Ojima M, Toshima Y, Koya E, Ara K, Tokuda H, Kawai S, et al. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. *J Appl Microbiol*. 2002;93:800-9.
8. Reynolds KA, Watt PM, Boone SA, Gerba CP. Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces. *Int J Environ Health Res*. 2005;15(3):225-34.
9. Watts JL, Lowery DE, Teel JF, Rossbach S. Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci*. 2000;83(10):2373-9.
10. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual da Qualidade. Determinação de Tensoativos Aniônicos e Catiônicos. Rev. 10. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011. Seção 4.3. 9 p. (65.3110.014 rev. 10).
11. Timenetsky J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. *Rev Saúde Pública*. 1990;24:47-50.
12. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147-79.

## Prevalência de enteroparasitas em crianças atendidas em unidades básicas de saúde em uma cidade do sul do Brasil

### Prevalence of enteroparasites in children attended at basic health unities in a Brazilian southern city

RIALA6/1561

Taís MATA-SANTOS<sup>\*1</sup>, Fabiane dos Anjos GATTI<sup>1</sup>, Carolina Silveira MASCARENHAS<sup>1</sup>, Lourdes Helena MARTINS<sup>1</sup>, Hílton Antônio MATA-SANTOS<sup>3</sup>, Juliana Montelli FENALTI<sup>1</sup>, Isabel Cristina de Oliveira NETTO<sup>2</sup>, Raúl Andrés MENDOZA-SASSI<sup>2</sup>, Carlos James SCAINI<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia, Área Interdisciplinar em Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua General Osório s/n, CEP: 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil, Tel.: (0xx) 53-32338871, E-mail: farmatais@hotmail.com

<sup>2</sup>Divisão População e Saúde, Faculdade de Medicina, FURG, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 06.11.2012 – Aceito para publicação: 24.06.2013

#### RESUMO

As helmintoses e protozooses intestinais constituem sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Este estudo analisou a prevalência de parasitas intestinais em crianças pré-escolares atendidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS) na cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram examinadas amostras de fezes de 144 crianças, no período de outubro de 2009 a março de 2010. A prevalência de parasitas patogênicos foi de 17,4 %, em que foram detectados ovos dos nematoides *Ascaris lumbricoides* (11,1 %) e *Trichuris trichiura* (6,3 %), e cistos do protozoário *Giardia lamblia* (4,9 %). Foram também identificados cistos de protozoários considerados não patogênicos, como *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis*, em 28,5 % das crianças. Em relação às prevalências nas UBS, as positivities foram de 36,4 % na UBS-1, 11,1 % na UBS-3, 14,8 % na UBS-4, 8 % na UBS-5 e 19,2 % na UBS-6. Na UBS-2 não foi detectada positividade nas amostras de fezes analisadas. A prevalência de parasitas patogênicos registrada na população estudada sugere a ocorrência de prováveis condições de reinfecção e a necessidade de implementar medidas de saneamento básico e de programas que possibilitem a melhoria da condição de vida dessas crianças.

**Palavras-chave.** parasitas intestinais, pré-escolar, saúde pública.

#### ABSTRACT

Helminthes and enteric protozoa are serious problem of public health in developing countries. This study analyzed the prevalence of intestinal parasites in preschool children attend at basic health unities (BHS) in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil. Stool samples collected from 144 children were analyzed, from October 2009 to March 2010. The observed prevalence rate for enteroparasites was 17.4 %, including eggs of nematodes *Ascaris lumbricoides* (11.1 %) and *Trichuris trichiura* (6.3 %), and cysts of protozoan *Giardia lamblia* (4.9 %). Also, cysts of protozoa considered as non-pathogenic, such as *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* and *Enteromonas hominis* were found in 28.5 % of children. Regarding to the BHSs prevalence, in BHS-1 was detected a positivity of 36.4 %, 11.1 % in BHS-3, 14.8 % in BHS-4, 8 % in BHS-5 and 19.2 % in BHS-6. No positivity was detected in the stool samples from BHS-2. The prevalence of intestinal parasites registered in the studied population suggests the occurrence of probable conditions for re-infection, and the need to implement the basic sanitation procedures and programs which will provide an improvement in the life quality of these children.

**Keywords.** intestinal parasites, preschool, public health.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, ocorreu um importante avanço científico e tecnológico, melhorando as condições de vida em geral, porém, em contraste, as parasitoses intestinais constituem-se ainda em um grave problema de saúde pública, acometendo mais de 1,5 bilhões de pessoas<sup>1</sup>. Embora as doenças parasitárias apresentem uma prevalência maior em países em desenvolvimento, principalmente, pela falta de recursos financeiros, de investimentos em saneamento básico e de projetos em educação sanitária<sup>2</sup>, trabalhos recentes sugerem que a prevalência das parasitoses parece estar subestimada em países desenvolvidos da América do Norte, da Europa e da Ásia<sup>3</sup>.

Quando se dá prioridade à observação da população infantil, a elevada prevalência de enteroparasitoses fica evidente, já que é um grupo mais vulnerável às condições socioeconômicas da comunidade a que pertencem<sup>1</sup>. O comprometimento do desenvolvimento físico, intelectual e social, além da morbimortalidade que as parasitoses intestinais podem gerar, principalmente em crianças menores de cinco anos (pré-escolar), é preocupante<sup>4</sup>.

Desse modo, a assistência médica e a educação sanitária da população são condições indispensáveis para o controle das parasitoses<sup>5</sup>. Controle e prevenção devem ser baseados na oferta de saneamento básico e na implementação de medidas de educação sanitária<sup>6</sup>, pois as altas prevalências também estão associadas aos hábitos de higiene inapropriados e ao baixo nível socioeconômico e educacional da população<sup>4</sup>.

A Estratégia de Saúde da Família (ESF) tem sido importante para a melhoria dos indicadores de saúde do Brasil<sup>7</sup>, porém é indispensável que sejam avaliadas as condições sanitárias da população assistida pela ESF, em especial alguns grupos com maior risco de morbimortalidade, entre eles, o das crianças em idade pré-escolar. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo conhecer o perfil parasitológico de crianças menores de cinco anos de idade, assistidas em Unidades Básicas de Saúde (UBS) da cidade do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de outubro de 2009 a março de 2010, realizou-se um estudo transversal em que foram

examinadas amostras de fezes de crianças, de zero a cinco anos de idade, assistidas em seis UBS da cidade do Rio Grande – RS, onde era realizado o Programa de Educação para o Trabalho em Saúde (PET-Saúde), em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde do município. No total, participaram do estudo 144 crianças, dentre as quais 33 eram oriundas da UBS-1, 15 da UBS-2, 18 da UBS-3, 27 da UBS-4, 25 da UBS-5 e 26 da UBS-6. Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética da Área da Saúde (CEPAS) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

A colheita das três amostras de fezes de cada criança foi realizada em dias alternados, sendo executada pelos responsáveis das crianças. As amostras foram acondicionadas em frascos coletores estéreis, previamente identificados com a data da colheita, nome da criança e o número da UBS. As amostras foram processadas no Laboratório de Parasitologia – Área Interdisciplinar em Ciências Biomédicas – Faculdade de Medicina (FAMED) – FURG.

As amostras foram processadas pelo método de centrífugo-sedimentação (C/S), utilizando a solução de formalina a 10 % e éter etílico<sup>8</sup>. O sedimento de cada amostra foi examinado em triplicata, sob microscópio óptico (aumento 100x e 400x), por dois pesquisadores. Os resultados do exame parasitológico de fezes foram encaminhados aos responsáveis das crianças e, nos casos positivos, estas foram encaminhadas às UBS e receberam tratamento específico.

## RESULTADOS

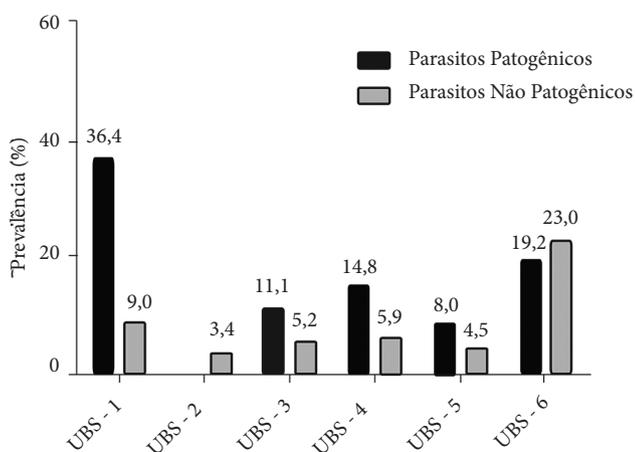
No total, foram examinadas 432 amostras de fezes de uma população formada por 144 crianças (três amostras/criança). A prevalência registrada foi de 45,9 % para parasitas patogênicos e não patogênicos. Das 56 crianças com exames parasitológicos de fezes positivos, 39 (70 %) apresentavam monoparasitismo e 16 (29 %) poliparasitismo.

A prevalência de 17,4 % (25) para os parasitas patogênicos incluem os helmintos *Ascaris lumbricoides* 11,1 % (16), *Trichuris trichiura* 6,3 % (10) e o protozoário *Giardia lamblia* 4,9 % (7), sendo que o monoparasitismo foi observado em 76 % (19) e o poliparasitismo em 24 % (6) das crianças.

Também foram detectados cistos de protozoários não patogênicos, como: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis*, em 28,5 % (41) das crianças. Em 31 crianças foram detectados apenas cistos desses

protozoários e em 10 houve detecção desses e de ovos de helmintos e cistos de outros protozoários.

Em relação às UBS, a positividade para parasitas patogênicos foi de 36,4 % em 33 crianças avaliadas na UBS-1, apresentando mais alta prevalência quando comparada com a UBS-6 que, das 26 crianças assistidas 19,2 % estavam parasitadas. Na UBS-4, das 27 crianças, 14,8 % foram positivas, na UBS-3, em 18 crianças houve positividade de 11,1 %, e na UBS-5, das 25 crianças, 8 % estavam positivas. Na UBS-2, 15 crianças foram avaliadas e não foi detectada positividade nas amostras de fezes. Quanto aos parasitas não patogênicos, também foi observada a prevalência mais alta na UBS-1 (Figura 1).



**Figura 1.** Prevalência de parasitas patogênicos e não patogênicos detectados em crianças entre 0 e 5 anos de idade de acordo com a Unidade Básica de Saúde (UBS) da cidade do Rio Grande, do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre outubro de 2009 e março de 2010

## DISCUSSÃO

A prevalência (17,4 %) para parasitas patogênicos registrada neste estudo revela efetividade nas ações realizadas nas UBS estudadas, as quais estão inseridas na ESF. Esse resultado é importante, já que a ESF é considerada como uma das principais estratégias de reorganização dos serviços e de reorientação das práticas profissionais nesse nível de assistência, na promoção da saúde, na prevenção de doenças e reabilitação.

A prevalência de 45,9 % para parasitas patogênicos e não patogênicos, detectada neste estudo, torna necessária a implementação de medidas de saneamento básico, programas de educação sanitária, exames parasitológicos periódicos e avaliação da eficácia do tratamento, assim como a ação do PET-Saúde, que tem como objetivo fortalecer a atenção básica em saúde

por meio da integração ensino, serviço e comunidade. As taxas de prevalência de 11,1 % e 6,3 % para os geohelmintos *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, respectivamente, justificam ainda mais a necessidade de implementação dessas medidas, uma vez que esses parasitas estão relacionados diretamente com a carência de saneamento básico, instalações sanitárias e hábitos de higiene<sup>6,4</sup>. Além disso, a detecção de cistos do protozoário intestinal *G. lamblia* demonstra problemas em relação à qualidade da água<sup>9</sup>. Também deve-se levar em consideração a possibilidade da transmissão zoonótica de *G. lamblia*<sup>10</sup>.

Os nematoides *A. lumbricoides* e *T. trichura* e o protozoário *G. lamblia* causam desde infecção assintomática a síndrome da má absorção, comprometimento do desenvolvimento físico e intelectual das crianças, diarreia crônica<sup>11</sup>, oclusão, perfuração intestinal e localizações ectópicas<sup>12</sup>. Apesar das enteroparasitoses não promoverem alta letalidade isoladamente, estas podem ser co-fatores de mortalidade infantil<sup>13</sup>.

Na UBS-1, foi registrada maior prevalência, sendo verificado que, das 12 crianças positivas, 10 (83,3 %) estavam parasitadas por *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, demonstrando possível reinfecção das crianças, uma vez que em todas as UBS é prestado serviço de assistência diária pelos profissionais da área da saúde. Entretanto, a população atendida na UBS-1, quando comparada com as demais UBS estudadas, apresenta condição de miséria, representada por higiene domiciliar precária, desemprego, maior concessão de bolsa-família e maior número de gestantes adolescentes e usuários de drogas. Todas as cinco UBS estão localizadas na periferia da área urbana do município estudado e têm como característica em comum a inexistência de saneamento básico, com uso de fossa séptica nos domicílios (dados não publicados).

A identificação de cistos dos protozoários não patogênicos, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Enteromonas hominis* aos seres humanos (28,5 %) também é relevante. Esse registro indica a ocorrência de contaminação de origem fecal humana, revelando problemas de higiene, bem como a potencialidade da transmissão de outros parasitas<sup>2</sup>, como foi confirmado neste estudo, com a identificação de ovos de *A. lumbricoides* e *T. trichiura* e cistos de *G. lamblia* nas fezes das crianças, pois a principal via de transmissão desses parasitas é a via fecal-oral<sup>14</sup>.

Os índices de parasitoses intestinais encontrados neste estudo demonstram a necessidade de melhoria no

saneamento básico e programas de educação sanitária, visando à melhoria da condição de vida da população estudada, bem como da comunidade<sup>6</sup>. Além disso, essas ações visam minimizar o risco de reinfecção.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization – WHO. Soil-transmitted helminth infections. [acesso 11 Jul 2013]. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/].
2. Agudelo-Lopez S, Rodríguez LG, Coronado X, Orozco A, Valencia-Gutierrez CA, Restrepo-Betancur LF, et al. Prevalencia de Parasitosis Intestinales y Factores Asociados en un Corregimiento de la Costa Atlántica Colombiana. *Rev Salud Pública*. 2008;10:633-42.
3. Barry MA, Weatherhead JE, Hotez PJ, Woc-Colburn L. Childhood parasitic infections endemic to the United States. *Pediatr Clin N Am*. 2013;60:471-85.
4. Andrade EC, Leite ICG, Rodrigues VO, Cesca MG. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Rev APS*. 2010;13:231-40.
5. Ferreira GR, Andrade CFS. Some socioeconomic aspects related to intestinal parasitosis and evaluation of an educational intervention in scholars from Estiva Gerbi, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38:402-5.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Plano nacional de vigilância e controle das enteroparasitoses. Brasília, DF, 2005; 42p.
7. Facchini L, Piccini R, Tomasei E, Silveira D, Siqueira F, Rodrigues M. Desempenho do PSF no Sul e Nordeste do Brasil: Avaliação institucional e epidemiológica da Atenção Básica à Saúde. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2006;11:669-81.
8. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull US Army Med Dept*. 1948;8:326.
9. Beck C, Araujo FAP, Olicheski ASB. Frequência da infecção por *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882) em cães (*Canis familiaris*) avaliada pelo método de Faust e Cols. (1939) e pela coloração da auramina, no município de Canoas, RS, Brasil. *Ciênc Rural*. 2005;35:126-30.
10. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacció SM. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol*. 2005;35:207-13.
11. Diniz-Santos DR, Jambeiro J, Mascarenhas RR, Silva LR. Massive *Trichuris trichiura* Infection as a Cause of Chronic Bloody Diarrhea in a Child. *J Trop Pediatr*. 2005;52:66-8.
12. Bhutia KL, Dey S, Singh V, Gupta A. *Ascaris lumbricoides* causing infarction of the mesenteric lymph nodes and intestinal gangrene in a child: a case report. *GMS*. 2011;9:1-6.
13. Macedo HS. Prevalência de Parasitos e Comensais Intestinais em Crianças de Escolas da Rede Pública Municipal de Paracatu (Minas Gerais). *Rev Bras Anal Clin*. 2005;37:209-13.
14. Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 11th edn. 494 pp. São Paulo, Atheneu. 2005.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional. A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

### POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas Nº 12, Nº 13 e Nº 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

### INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

### 1. CATEGORIA DE ARTIGOS

**1.1 ARTIGOS ORIGINAIS:** Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

#### INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

**1.2 ARTIGOS DE REVISÃO:** Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

**1.3 COMUNICAÇÕES BREVES:** São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

**1.4 NOTAS CIENTÍFICAS:** São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

**1.5 RELATOS DE CASO:** São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

### Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

**1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES:** São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

**Informações complementares:**

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

**2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO:** Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

**2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO:** Deve constar:

**Título em português e em inglês:** O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

**Autores:** De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (\*) e apresentar também o endereço completo.

**Afiliação:** Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

**Financiamento da pesquisa:** Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

**Apresentação prévia:** Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

**2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:**

**Resumo/Abstract:** Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

**Palavras-chave/keywords:** Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

**Estrutura do texto:**

**A) Introdução:** Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

**B) Material e Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

**C) Resultados:** Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

**D) Discussão:** A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

**E) Agradecimentos:** Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

**2.3 CITAÇÃO NO TEXTO:** A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

**Exemplos:** Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.

Segundo Chang et al<sup>31</sup>, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

**2.4 REFERÊNCIAS:** Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

### Exemplos:

#### Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Henington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

#### Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [[http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=10149](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149)].

#### Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

#### Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

**Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:**

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

**Dados eletrônicos:**

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci].

**Legislação:**

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

**Autoria institucional:**

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

**Patente:**

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

**2.5 Números de figuras e tabelas:** A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

**A) Tabelas:** Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

**B) Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

**3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS:** Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

▪ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).

Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.

Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

#### 4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

**5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA:** Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

**6. PROVAS:** Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

**7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO:** Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

Assessoria Editorial:

**TIKINET**

[www.tiki.net.br/tiki](http://www.tiki.net.br/tiki)





SECRETARIA  
DA SAÚDE

