

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Jessica Soldani Couto

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE ENSAIOS EM LABORATÓRIOS DE
MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS**

Rio de Janeiro

2021

Jessica Soldani Couto

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE ENSAIOS EM LABORATÓRIOS DE
MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Tutor: Silvia Maria dos Reis Lopes

Preceptor: Nathalia Gonçalves Santos Caldeira

Rio de Janeiro

2021

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Soldani Couto, Jessica

Desenvolvimento de Material de Referência de *Staphylococcus aureus* para o Controle de Qualidade de Ensaios em Laboratórios de Microbiologia de Alimentos. / Jessica Soldani Couto. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2021.

37 f. : fig. ; tab.

Monografia (Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

Tutora: Silvia Maria dos Reis Lopes.

Preceptora: Nathalia Gonçalves Santos Caldeira.

1. Material de Referência. 2. Alimentos. 3. *Staphylococcus Aureus*. 4. Bactéria de Referência. I. Título.

Development of *Staphylococcus aureus* Reference Material for Testing Quality Control in Food Microbiology Laboratories.

Jessica Soldani Couto

DESENVOLVIMENTO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE ENSAIOS EM LABORATÓRIOS DE
MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em: 26/02/2021

BANCA EXAMINADORA

D.ra Lucia Helena Pinto Bastos

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

D.ra Cátia Aparecida Chaia de Miranda

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

D.ra Marcelo Luiz Lima Brandão

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

D.ra Silvia Maria dos Reis Lopes (Tutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

M.^a Nathalia Gonçalves Santos Caldeira (Preceptor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus queridos pais, Suely e João, que sempre estiveram ao meu lado em cada escolha de vida e me deram todo o apoio e carinho necessários.

Ao meu irmão Guilherme, com sua mente criativa me impulsionando a pensar longe.

Ao meu namorado Thiago, por todo amor, companheirismo e inspiração em todos esses anos, e pela torcida de sempre pelo meu sucesso.

A todas as minhas amigas de diferentes círculos sociais que estiveram do meu lado, principalmente nesse momento de grande aflição com a pandemia, me proporcionando uma importante rede de apoio e incentivo mútuo.

À minha Tutora Silvia Lopes, por toda disponibilidade, paciência e carinho ao me orientar, além de todo o ensinamento e conhecimento transmitidos durante a minha vivência no laboratório, que me fizeram amar ainda mais a Microbiologia de Alimentos.

À minha Preceptora Nathalia Caldeira, que acompanhou minhas rotinas diárias e me instruiu de diferentes formas, contribuindo para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A todos os que faziam parte do meu laboratório que, um por um, foram responsáveis pelo meu aprendizado e crescimento ali dentro.

Às minhas companheiras de laboratório e Residência, eternas amigas, que fizeram meus almoços mais alegres e que compartilharam comigo momentos inesquecíveis.

Aos setores de meio de cultura e esterilização, por proporcionarem os insumos necessários para o desenvolvimento de todo este trabalho.

Ao programa INOVA Fiocruz pelo auxílio financeiro.

À Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz - IOC - pela realização da etapa de sequenciamento das amostras.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS - no qual sinto orgulho de ter feito parte, e que me proporcionou uma bagagem incrível para o mercado de trabalho, baseada em evidência científica, além de uma visão ampliada da regulação no nosso país.

À Fundação Oswaldo Cruz, por me dar a oportunidade de trabalhar em uma instituição de tamanha excelência e reconhecimento mundial, que prova dia após dia o seu valor para a sociedade.

E a todos que contribuíram de alguma forma para mais essa conquista.

Fé eterna na ciência.

Oswaldo Cruz

RESUMO

O controle da qualidade em laboratórios de ensaios tem como objetivo a garantia da qualidade dos resultados. A NBR ISO/IEC 17025:2017 é a norma do sistema da qualidade mais utilizada em laboratórios e descreve os requisitos para obtenção de resultados precisos e confiáveis. Um desses requisitos é a utilização de materiais de referência (MR) como controle interno das análises. As bactérias de referência são obtidas de coleções, na maioria internacionais, porém o alto custo para aquisição e os requisitos para a importação dificultam a obtenção pelos laboratórios brasileiros. Portanto, destaca-se a importância do desenvolvimento de bactérias de referência nacionais, isoladas de alimentos, para serem utilizadas como controle interno em análises de alimentos. O objetivo do trabalho foi desenvolver um MR de *Staphylococcus aureus* para uso em análises de microbiologia de alimentos. Foram selecionadas 10 cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos pelo Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz). Foi realizada a identificação fenotípica com uso do sistema Vitek 2.0 e genotípica pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A caracterização clonal dos isolados foi realizada pela técnica *enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction* (ERIC-PCR). A escolha da cepa candidata a bactéria de referência (CBR) foi realizada pela análise filogenética dos isolados comparados com cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) que são comumente utilizadas nos ensaios microbiológicos. A partir da cepa selecionada, foi produzido um lote de CBR e realizados os testes de pureza, estudo de homogeneidade e estabilidade em curta duração nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e em longa duração nas temperaturas de $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ e de $\leq -70^\circ\text{C}$. A avaliação estatística da homogeneidade foi realizada pelo protocolo harmonizado e dos estudos da estabilidade por análise de variância da regressão linear segundo a ABNT ISO GUIA 35:2012. Os 10 isolados foram identificados fenotipicamente como *S. aureus*. Na análise do gene 16S rRNA, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank para identificação e certificação dos isolados. A cepa 44, isolada de hambúrguer bovino, possuía 87,5% de similaridade com a cepa ATCC 6538P de acordo com o dendograma construído a partir da ERIC-PCR, sendo selecionada como CBR. O lote produzido foi considerado puro, suficientemente homogêneo e estável durante 12 meses nas temperaturas de $-20 \pm 4^\circ\text{C}$ e de $\leq -70^\circ\text{C}$. Na estabilidade em curta duração o lote foi suficientemente estável em temperatura \leq

4°C por até quatro dias. O lote se mostrou adequado para utilização como MR em ensaios de análise de alimentos que utilizam *S. aureus* como controle interno.

Palavras-chave: Material de Referência. Alimentos. *Staphylococcus Aureus*. Bactéria de Referência.

ABSTRACT

Quality control in testing laboratories aims to guarantee the quality of the results. The NBR ISO/IEC 17025:2017 is the most widely used quality system standard in laboratories and describes the general requirements for consistent and reliable results. One of these requirements is the use of reference materials (RM) as an internal control in assays. The reference strains in Brazil are generally obtained from international collections, but this achievement is hampered by the high acquisition cost of biological materials and severe import requirements. Therefore, the importance of developing reference materials isolated from food in our country is highlighted, to be used as an internal control in food assays. The aim of this study was develop RM of *Staphylococcus aureus* to be used in food analysis. It was selected 10 *S. aureus* strains isolated from food by Food Sector of Microbiology Department that belongs to National Institute for Quality Control in Health from Oswaldo Cruz Foundation (INCQS/Fiocruz). Phenotypic and genotypic identification was performed using the Vitek 2.0 system and by sequencing the 16S rRNA gene, respectively. The clonal characterization of the isolates was performed using the enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique. The strains candidate for reference bacteria (CRB) was chosen by phylogenetic assay compared with the strains from American Type Culture Collection (ATCC) that are commonly used in microbiological assays. From the chosen strain, a batch of CRB was produced. The tests of purity, homogeneity and stability study in short term (at temperatures of $4 \pm 2^\circ \text{C}$ and $35 \pm 2^\circ \text{C}$) and long term (at temperatures of $-20 \pm 4^\circ \text{C}$ and $\leq -70^\circ \text{C}$) were performed. The statistical evaluation of homogeneity was performed using the harmonized protocol and, for stability studies, by analysis of variance and linear regression, according to ABNT ISO GUIA 35:2012. The 10 isolates were phenotypically identified as *S. aureus*. The sequences obtained in the analysis of the 16S rRNA gene were compared with those available in the GenBank database for identification and certification of isolates. Strain 44, isolated from beef hamburger, had 87.5% similarity to the ATCC 6538P strain according to the dendogram built from ERIC-PCR, being selected as CRB. The batch produced was considered pure, sufficiently homogeneous and stable for 12 months at temperatures of $-20 \pm 4^\circ \text{C}$ and $\leq -70^\circ \text{C}$. In the short term stability, the batch was sufficiently stable at temperature $\leq 4^\circ \text{C}$ for up to four days. The batch proved to be suitable for use as RM in food analysis tests that use *S. aureus* as an internal control.

Key-words: Reference Material. Food. *Staphylococcus Aureus*. Reference Bacteria.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA no Brasil nos anos de 2009 a 2018.	13
Tabela 1 - Identificação fenotípica dos isolados de <i>S. aureus</i> e cepas de referência provenientes da ATCC pelo sistema Vitek 2.0.....	24
Tabela 2 - Comparação das 10 cepas selecionadas com cepas de <i>S. aureus</i> depositadas no banco de dados GenBank	25
Figura 2 - Dendograma das 10 cepas selecionadas de <i>S. aureus</i> e cepas de referência oriundas da <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC).....	26
Tabela 3 - Resultados das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) do teste de homogeneidade do lote de CBR STA.....	27
Tabela 4 - Resultado estatístico da avaliação da homogeneidade pelo protocolo harmonizado	28
Tabela 5 - Análise estatística do estudo da estabilidade (ANOVA pela regressão linear - ISO GUIA 35) do lote CBR STA	29
Figura 3 - Estudo da estabilidade em curta duração nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ \text{C}$ e $35 \pm 2^\circ \text{C}$ do lote CBR STA durante 10 dias.	30
Figura 4 - Estudo da estabilidade em longa duração nas temperaturas de $-20 \pm 4^\circ \text{C}$ e $\leq -70^\circ \text{C}$ do lote CBR STA durante 12 meses.	31

LISTA DE SIGLAS

ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	-	Análise de Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	-	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBR	-	Candidato a Bactéria de Referência
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DTA	-	Doenças Transmitidas por Alimentos
ERIC-PCR	-	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction</i>
FAO	-	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
IEC	-	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INCQS	-	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	-	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOC	-	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	-	<i>International Organization for Standardization</i>
LACEN	-	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
MR	-	Material de Referência
MRC	-	Material de Referência Certificado
MS	-	Ministério da Saúde
NBR	-	Norma Brasileira
NIT-DICLA	-	Norma Inmetro Técnica-Divisão de Acreditação de Laboratórios
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PCR	-	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RDC	-	Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA	-	Ácido ribonucleico ribossomal
Sinan	-	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNVS	-	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SSP	-	Solução Salina Peptonada
TSA	-	Ágar Trypticaseína de Soja
UFC	-	Unidades Formadoras de Colônia

- UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average*
- WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Doenças transmitidas por alimentos	12
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3 Vigilância sanitária.....	15
1.4 Material de referência	15
1.5 Técnicas de caracterização de microrganismos	16
1.6 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 Tipo e condições do estudo.....	20
3.2 Seleção e caracterização das cepas bacterianas	20
3.3 Produção do lote	21
3.4 Controle do lote produzido	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Caracterização das cepas bacterianas	24
4.2 Produção e controle do lote.....	26
5 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

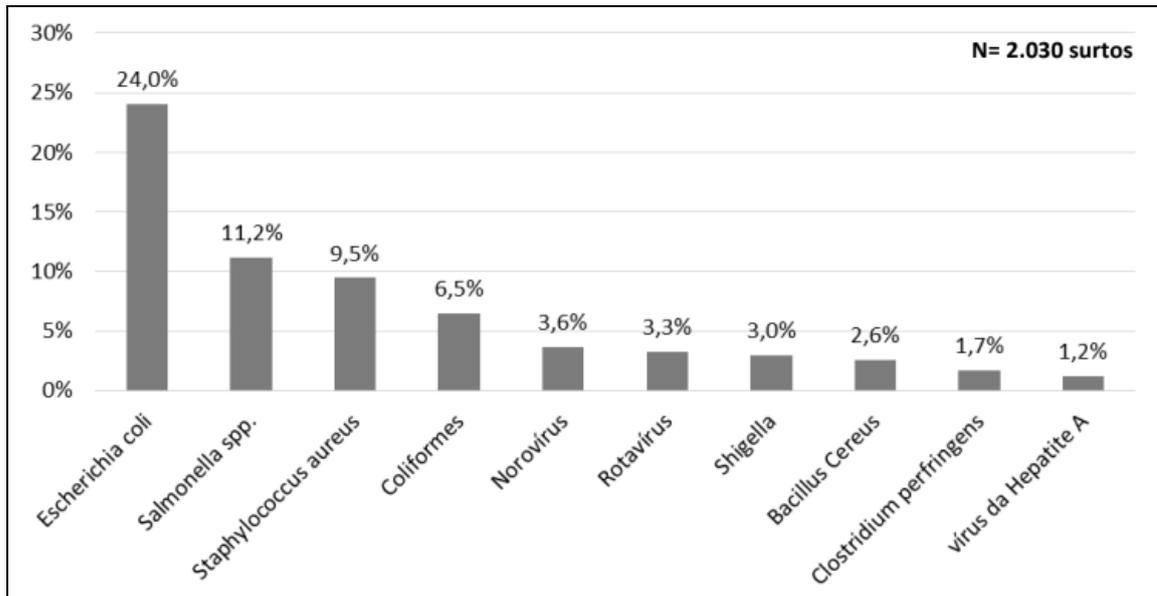
1.1 Doenças transmitidas por alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) afetam pessoas no mundo todo. Elas são causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados por perigos de natureza física, química ou biológica, o último sendo um agente infeccioso específico ou sua toxina, ocasionando sintomas como anorexia, diarreia, náuseas, vômitos ou manifestações extraintestinais. O crescente aumento das populações e sua maior exposição aos alimentos prontos para consumo, alimentos consumidos fora de casa e em vias públicas, a necessidade de produção em grande escala e inovações por conta da globalização são alguns dos fatores que contribuem para a emergência das doenças de origem alimentar (BRASIL, 2010).

Os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) nos anos de 2007 a 2015 demonstraram que um em cada 10 indivíduos do mundo apresentavam sintomas após o consumo de alimentos contaminados e que, destes, 420 mil morriam a cada ano (WHO, 2015). No Brasil, em 2018, foram registrados 597 surtos, 8.406 doentes, 916 hospitalizados e nove óbitos (BRASIL, 2019a). Contudo, é sabido que os dados de DTA costumam ser subnotificados, já que a maioria dos casos são autolimitantes, sendo resolvidos de forma rápida e, até mesmo, sem que necessite de intervenção médica (MELO *et al*, 2018; DRAEGER *et al*, 2019).

Segundo a última publicação dos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2018, os quatro agentes etiológicos mais frequentes nos surtos do país são de origem bacteriana. Dentre eles, *Staphylococcus aureus* ocupa o terceiro lugar como o agente mais identificado, integrando 9,5% dos surtos no Brasil naquele período (Figura 1) (BRASIL, 2019a).

Figura 1 - Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA no Brasil nos anos de 2009 a 2018



Fonte: Sinan/SVS/Ministério de Saúde (BRASIL, 2019a).

1.2 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são classificados como cocos Gram positivos, sendo comumente visualizados em pares ou em forma de “cachos de uva” na microscopia pela coloração de Gram. Podem ser encontrados nos alimentos, no ambiente e nos animais, porém, sua relação com as condições higiênico-sanitárias está intimamente relacionada com a presença na pele, mucosas, e principalmente, no trato nasofaríngeo de humanos portadores assintomáticos (FDA, 2012; TONDO; BARTZ, 2012). São anaeróbios facultativos, não móveis e resistentes a uma ampla faixa de temperatura (entre 6 e 48°C, com crescimento ótimo a 37°C), pH (4,2 a 9,3, com ótimo entre 7 e 7,5) e toleram concentrações de até 25% de cloreto de sódio (MCCULLOCH; MAMIZUCA, 2015).

Atualmente, existem mais de 50 espécies de *Staphylococcus* spp. descritas na literatura, além de 30 subespécies, sendo o *S. aureus* o principal agente causador de surtos de DTA, provocada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos (BRANDÃO *et al*, 2013a; LPNS, 2020). O *S. aureus* tem a capacidade de produzir diferentes tipos de fatores de virulência como cápsulas e adesinas, algumas enzimas como a coagulase, catalase, hialuronidase e esfiloquinase, além de diversas toxinas. A coagulase é um dos principais fatores de virulência do *S. aureus*, que atua na conversão de fibrinogênio em fibrina, e essa fibrina é capaz de proteger o microrganismo da fagocitose no hospedeiro. Além disso, é um importante critério na identificação de *S. aureus*, já que existem outras espécies do gênero

Staphylococcus que não produzem essa enzima. Dessa forma, os microrganismos podem ser classificados como Estafilococos coagulase positiva ou Estafilococos coagulase negativa (JAVID *et al*, 2018).

A manipulação de alimentos por indivíduos portadores de *S. aureus* e posterior armazenamento destes em temperaturas ótimas para o crescimento do microrganismo e produção da sua enterotoxina é a principal causa epidemiológica de intoxicação alimentar estafilocócica. A enterotoxina começa a ser produzida no alimento quando o crescimento bacteriano atinge concentrações $\geq 10^5$ células/g. Os alimentos que costumam estar relacionados a essa doença incluem carnes, frangos, peixes, ovos, cogumelos enlatados, produtos lácteos, molhos para salada, presunto e salame, produtos de panificação e outros que requerem manipulação considerável durante a preparação, mantidos em temperaturas insatisfatórias. Os sintomas iniciam rapidamente após a ingestão do alimento contaminado com a toxina pré-formada, causando principalmente náuseas, cólicas abdominais e emese, com ou sem diarreia, sendo considerada uma doença autolimitante, já que a concentração da toxina diminui com o quadro de emese e possível diarreia (FORSYTHE, 2013; MCCULLOCH; MAMIZUCA, 2015).

Em 2019, foi instituído um novo marco regulatório em relação aos padrões microbiológicos com a publicação da RDC nº 331/2019, que dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação, juntamente com a Instrução Normativa 60/2019, que estabeleceu as listas de padrões microbiológicos (BRASIL, 2019b,c). A legislação incluiu o parâmetro de ausência de enterotoxinas estafilocócicas em queijos, requeijão, leite em pó, doce de leite e outros produtos lácteos similares, já que a não identificação de estafilococos coagulase positiva nos alimentos analisados não indica necessariamente a ausência de enterotoxinas, uma vez que estas são termoestáveis, não sendo eliminadas após tratamento térmico do produto contaminado (ANVISA, 2020). A análise da qualidade microbiológica dos alimentos disponíveis ao consumidor é realizada por laboratórios da rede pública e privada distribuídos pelo país, que devem seguir os novos padrões estabelecidos. Os alimentos devem passar por avaliação durante sua produção (pré-mercado) realizada, no caso dos setores regulados, pelos laboratórios de controle de qualidade. Uma vez comercializados, os alimentos sofrem avaliação pós-mercado como parte do controle, inspeção e fiscalização do produto pelos órgãos de vigilância sanitária (JACOB, 2014).

1.3 Vigilância sanitária

O termo Vigilância Sanitária compreende um conjunto de ações que visam eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, além de ações que buscam intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, produção e circulação de bens, e da prestação de serviços de interesse da saúde. Essas ações incluem o controle de bens de consumo em todas as suas etapas e processos e o controle de prestação de serviços, ambos se relacionando direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990). O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) atua na regulação, normatização, controle e fiscalização nessa área, e é composto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz) em nível federal. Também fazem parte do SNVS os serviços de vigilância sanitária estaduais e municipais, além dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) (LOPES; de SETA, 2017).

Os LACENs são responsáveis pelo controle da qualidade de produtos vinculados ao SNVS, e desta forma, devem garantir resultados precisos e confiáveis (LOPES; de SETA, 2017; ABNT, 2017a).

O sistema de qualidade mais utilizado para gestão de laboratórios de ensaios é o contido na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. Nela estão descritos os requisitos que os laboratórios devem atender para demonstrar competência técnica e capacidade de produzir resultados precisos, confiáveis e rastreáveis. Pode-se obter a garantia do desempenho analítico através da participação do laboratório em ensaios de proficiência e pela utilização de controle interno durante os ensaios realizados (ABNT, 2017a).

1.4 Material de referência

Define-se material de referência (MR) como um material suficientemente homogêneo e estável em relação a uma ou mais propriedades especificadas, e assim, adequado para o uso pretendido em um processo de medição e comparação nas análises realizadas. O MR pode ser utilizado em ensaio de proficiência (EP) e como controle interno em paralelo ao ensaio, garantindo o monitoramento frequente da sua reprodutibilidade (ABNT, 2016).

Quando o MR possui uma ou mais propriedades validadas metrologicamente para um uso específico, juntamente com um certificado que descreve o valor de sua propriedade, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica, ele é conhecido como

Material de Referência Certificado (MRC). Com essas propriedades, o MRC pode ser utilizado em processos analíticos bem mais complexos em relação aos não certificados, como validação e desenvolvimento de métodos, controle em processos de calibração, isto é, ensaios dos quais o objetivo é obter resultados e medições exatas (ABNT, 2012; ABNT, 2016).

É possível utilizar um MR em diversas categorias de ensaio, como na análise microbiológica de água e alimentos. Neste caso, têm-se os MR microbiológicos, representados por bactérias de referência ou mesmo partes do microrganismo, como seu DNA genômico, plasmidial ou sua toxina específica, por exemplo. Os MR microbiológicos são incorporados a diferentes matrizes de alimentos e agentes crioprotetores que têm o papel de facilitar a utilização destes nos ensaios e garantir a estabilidade nas diferentes temperaturas de transporte e armazenamento (ROSAS *et al.*, 2019).

Os produtores de MR devem seguir os critérios da norma ABNT NBR ISO 17034:2017, que descreve os “Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência”. O planejamento das etapas de produção, bem como a distribuição do material, são alguns dos parâmetros compreendidos na norma, e estes precisam ser detalhados, documentados e controlados (ABNT, 2017b). A avaliação da homogeneidade e estabilidade são essenciais para a garantia da qualidade dos materiais produzidos e devem ser realizados em conformidade com a ABNT ISO GUIA 35:2012 (ABNT, 2012).

A NIT-DICLA 61:2018, norma técnica do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, complementa as normas da qualidade relacionadas à produção de MRs que utilizam microrganismos, incluindo na seleção do material biológico a verificação de sua autenticidade e integridade de seu genoma através de análises fenotípicas e moleculares. Dessa forma, o microrganismo é devidamente caracterizado, garantindo o uso de cepas genuínas (INMETRO, 2018).

1.5 Técnicas de caracterização de microrganismos

Existem diversas técnicas rápidas utilizadas para identificação fenotípica bacteriana além da bioquímica convencional. Como exemplos de técnicas rápidas, temos os sistemas miniaturizados API 20E e ID 32. Esses sistemas utilizam uma tira plástica contendo diferentes testes bioquímicos e enzimáticos em compartimentos individuais, que ao entrarem em contato com o microrganismo e após tempo de incubação determinado, alteram sua cor de acordo com a reação provocada. As cores são interpretadas com o auxílio de uma tabela, e posteriormente, é utilizado programa para identificação do microrganismo (O'HARA, 2005).

Além disso, existe também um sistema automatizado bem semelhante aos sistemas anteriores, mas que utiliza cartões com os diferentes testes que são lidos por um equipamento e comparados ao banco de dados de cepas da empresa. Um sistema muito utilizado que utiliza essa tecnologia é o Vitek (FUNKE; FUNKE-KISSLING, 2005; WALLET *et al*, 2005; DELMAS *et al*, 2008; SULAIMAN *et al*, 2018). Os sistemas de identificação rápida oferecem vantagens importantes em relação aos métodos convencionais, incluindo mão de obra reduzida, erro humano reduzido, maior rendimento da amostra e tempos de resposta mais rápidos. Entretanto, existem algumas limitações no uso dessas tecnologias, como a necessidade de equipe treinada, além dos custos de obtenção (ODUMERU *et al*, 1999).

Em relação às técnicas moleculares, o sequenciamento do gene 16s rRNA é bastante utilizado por estar presente em todas as bactérias e ser altamente conservado, sendo possível diferenciar as espécies pelas regiões variáveis desse gene (CHAKRAVORTY *et al*, 2007). São utilizados iniciadores específicos e a análise é feita a partir da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), que consiste em uma sucessão de ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, capazes de multiplicar de forma exponencial o número de cópias da sequência alvo (CHAKRAVORTY *et al*, 2007; WANG; QIAN, 2009). Dessa forma, com a amplificação do gene 16s rRNA e seu posterior sequenciamento é possível avaliar a similaridade genética entre diferentes cepas depositadas em bancos de dados de sequências, como GenBank, EzBioCloud e EzTaxon, por exemplo (CHUN *et al*, 2007, BENSON *et al*, 2015; YOON *et al*, 2017).

Outra técnica que utiliza a amplificação por PCR como base é a *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR* (ERIC-PCR), que permite comparar e identificar variações no conteúdo genético de estirpes bacterianas homólogas, e comparar as cepas estudadas através de um dendograma gerado a partir dos *fingerprints*, demonstrando as relações filogenéticas e clonais das estirpes (VERSALOV *et al*, 1991; RANJBAR *et al*, 2017).

É comum o uso de mais de uma técnica de caracterização dos microrganismos a fim de garantir os resultados obtidos (AYENI *et al*, 2017; FURLAN *et al*, 2019; RUDOLPH *et al*, 2019).

1.6 Justificativa

No Brasil, o *S. aureus* corresponde a um dos três principais agentes responsáveis pela ocorrência de surtos de DTA (BRASIL, 2019a). A segurança microbiológica de água e

alimentos é uma grande preocupação mundial e as diversas formas de controle higiênico-sanitário são fundamentais para a prevenção dessas doenças (BRASIL, 2010). O controle da qualidade em laboratórios que realizam ensaios tem como objetivo a garantia dos resultados das análises. Em se tratando de produtos destinados ao consumo humano, resultados de análises não confiáveis podem gerar perdas econômicas significativas em processos de produção e, sobretudo, problemas de saúde pública (MORAIS, 2014).

Os laboratórios nacionais geralmente utilizam MRs de coleções internacionais para controle interno das suas análises, sendo o *American Type Culture Collection* (ATCC) um dos principais (ROSAS *et al*, 2019). Por conta da dependência dos laboratórios nacionais na utilização de cepas de referência de instituições internacionais, é importante o reconhecimento de laboratórios brasileiros devidamente capacitados na produção de MRs microbiológicos de origem nacional.

Dessa forma, é possível destacar o grande ganho com o estabelecimento desses materiais a partir de cepas isoladas de alimentos, através de critérios e normas específicas esse fim, como forma de diminuir a dependência da utilização de MR internacionais, além de ser possível distribuir aos laboratórios um material confiável e, no caso de laboratórios públicos vinculados ao SNVS, sem custo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um MR de *S. aureus* para controle da qualidade de ensaios em laboratórios de microbiologia de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos;
- Identificar fenotípica e genotipicamente as cepas selecionadas;
- Caracterizar as cepas pela ERIC-PCR para escolher o CBR;
- Produzir um lote de CBR de *S. aureus* pela técnica de liofilização;
- Realizar os testes de controle do lote produzido (teste de pureza, avaliação da homogeneidade e estabilidade).

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo e condições do estudo

O presente estudo é do tipo quantitativo exploratório e foi realizado no INCQS e na Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), ambos no campus da Fiocruz na cidade do Rio de Janeiro, de acordo com metodologia descrita a seguir.

3.2 Seleção e caracterização das cepas bacterianas

Foram selecionadas 10 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos da coleção do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS. Foram utilizadas as seguintes cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 12600, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P e *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 25923.

A identificação fenotípica das cepas foi realizada pelo sistema semiautomático Vitek 2 Compact (BioMérieux, Rhône, França) utilizando cartão GP segundo as recomendações do fabricante.

A identificação genotípica foi realizada pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCCTGG CTC AG-3') descrito por Lane (1991) e 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') descrito por Turner et al (1999).

Os produtos da PCR foram purificados com uso do Kit QIAquick PCR Purification (Qiagen®, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciados em duplicata para cada iniciador, utilizando terminadores dideoxi fluorescentes (BigDye; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um sequenciador de DNA automatizado (Applied Biosystems ABI Prism 3730) de acordo com protocolo da Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC (OTTO *et al*, 2008), sendo as sequências obtidas comparadas àquelas depositadas no GenBank DataBase.

A tipificação dos isolados foi realizada pela técnica ERIC-PCR proposta por Versalovic, Koeuth e Lupski (1991) utilizando o iniciador ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), com o objetivo de avaliar a similaridade genética entre os isolados e as cepas de referência. Na mistura da reação, foram adicionados em cada tubo 12,5 µL de GoTaq G2 Master Mix (Promega, Madison, EUA), 0,5 µL do iniciador, 3 µL

do DNA e 9 μL de água livre de nuclease. A reação de PCR seguiu o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 45 ciclos a 94°C por 1 min, 45°C por 1 min e 74°C por 1 min, seguido de extensão a 74°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X por 3h a 60 V. Os fragmentos foram marcados com o agente intercalante GelRed (Biotium, Hayward, EUA) e visualizados através do programa L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) para comparação. Os padrões de bandas foram analisados através do Programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os dendogramas foram construídos com a utilização do índice de Dice e o método “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average” (UPGMA). O isolado que apresentou a maior similaridade genética com uma das cepas de referência foi selecionado para a produção do lote CBR.

3.3 Produção do lote

A partir do criotubo contendo a cepa selecionada foi realizado o teste de pureza do material, pela técnica de esgotamento em ágar tripticaseína de soja (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Paralelamente, 100 μL do material foi semeado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merk, Darmstadt, Alemanha). A placa de TSA e o BHI foram incubados a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Da cultura do caldo BHI alíquotas de 1 mL, foram transferidas para microtubos estéreis com capacidade de 2 mL. Os microtubos foram centrifugados a 7.000 rpm/10 min (Eppendorf 5418, Hamburgo, Alemanha) e os sobrenadantes descartados. Foi adicionado 1 ml de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1 % (preparo por formulação) aos microtubos, que após homogeneização em aparelho agitador de tubos (MS 3 Digital, Ika, Staufen, Alemanha) foram novamente centrifugados nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e dois microtubos foram ressuspensos com 1 mL de solução de sacarose a 100 mM (Sigma, Saint Louis, EUA). Foi realizada a leitura da transmitância em aparelho colorímetro (Libra S2, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) e em comprimento de onda de 520 nm para verificar a concentração de células na suspensão. A concentração foi ajustada até atingir 2% de transmitância. As leituras foram repetidas até atingir cinco mililitros da cultura.

O volume de 5 mL da suspensão foi transferido para um béquer contendo 495 mL de leite desnatado estéril (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), esterilizado a 110°C por 10 min, suplementado com 100 mM de sacarose como crioprotetor. Foi adicionado um magneto

estéril ao béquer e posicionado na superfície de um aparelho agitador magnético (Corning, Tewksbury, EUA) . A suspensão foi submetida a agitação por aproximadamente 20 min.

Para o controle da concentração de células na matriz, foram preparadas diluições decimais, de forma a se obter contagens entre 25-250 unidades formadoras de colônia (UFC). A análise foi realizada em duplicata, pela técnica *pour plate* em TSA. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h e posteriormente submetidas a contagem, a fim de se verificar a concentração final do lote.

Volumes de 1 mL da suspensão da matriz contendo o microrganismo foram distribuídos em 400 frascos de vidro estéreis (Schott, São Paulo, Brasil) acondicionados em estante de aço própria para o liofilizador Minifast 4 (IMA Life, Beijing, China), com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Falmouth, Inglaterra). Posteriormente, em cada frasco, foi acoplada uma rolha de borracha estéril própria para liofilização (West, São Paulo, Brasil). A estante contendo os frascos foi acondicionada em recipiente plástico, limpo e fechado e estocado em ultrafreezer $\leq -70^{\circ}\text{C}$, por um período mínimo de 15 h.

Os frascos dos lotes foram submetidos a um ciclo de liofilização por um período de 24h. Após o término do ciclo, os frascos foram fechados sob vácuo. A presença de vácuo nos frascos foi verificada, com a utilização de um aparelho emissor de centelha elétrica (Edwards, California, EUA) e os que não apresentaram vácuo foram descartados. Como critério de aceitação do lote, foi considerado valor de vácuo superior a 80% do total de itens liofilizados (PRODUÇÃO, 2020).

Os frascos foram identificados com as seguintes especificações: “Candidato a Bactéria de Referência”, com a sigla CBR, com a identificação da bactéria (STA), do ano de produção e da numeração do frasco no lote. Os frascos foram lacrados com tampa de metal utilizando alicate recravador, armazenados em caixas identificadas e estocados. Na temperatura de armazenamento ($-20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) foram estocados 24 frascos, sendo o restante armazenado em ultrafreezer na temperatura de referência ($\leq -70^{\circ}\text{C}$).

3.4 Controle do lote produzido

Os frascos foram submetidos aos testes de pureza, homogeneidade e estabilidade. A pureza foi realizada em 2% dos frascos do lote produzido utilizando meio TSA com incubação a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h segundo Rosas (2018).

Para o teste da homogeneidade foi realizada uma avaliação quantitativa. Os frascos foram analisados sob condições de repetitividade, através de contagem por plaqueamento

direto. Foram selecionados de forma aleatória sistemática 22 frascos. O cálculo do número mínimo de frascos a serem analisados no teste, foi obtido através da aplicação da fórmula: $3x\sqrt[3]{n}$, onde n é o número de frascos produzidos (BRITISH STANDARDS, 1976; ROSAS, 2018). Os frascos foram retirados do ultrafreezer e acondicionados em temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este período, os frascos foram hidratados com 1 mL de SSP a 0,1%, homogeneizados e diluídos em solução SSP a 0,1% até a diluição 10^{-2} . Volumes de 0,1 mL foram semeados, em duplicata, em superfície de ágar Baird Parker (Merk, Darmstadt, Alemanha) e incubados em posição invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h para contagem de UFC. Os valores das contagens foram expressos em \log_{10} e registrados. A avaliação estatística da homogeneidade foi realizada utilizando como base o Protocolo Harmonizado (THOMPSON *et al*, 2006). Foi estabelecido o desvio padrão alvo ($\log_{10}=0,25$), considerado como critério de aceitação para o teste (ROSAS, 2018). O estudo da estabilidade foi realizado em curta e longa duração utilizando a mesma metodologia da homogeneidade. A estabilidade em curta duração foi realizada nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$, foram selecionados dois frascos por dia, para cada temperatura, durante 10 dias. Para o estudo em longa duração, foram selecionados dois frascos por mês nas temperaturas de armazenamento ($-20 \pm 4^\circ\text{C}$) e de referência ($\leq -70^\circ\text{C}$), que foram avaliados pelo período de 12 meses.

Os valores das contagens foram expressos em \log_{10} e registrados. A avaliação estatística do teste foi baseada na análise da variância (ANOVA) seguindo as orientações da ABNT ISO GUIA 35:2012.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das cepas bacterianas

Os 10 isolados analisados foram identificados fenotipicamente como *S. aureus* e a confiança da identificação variou de muito boa a excelente (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação fenotípica dos isolados de *S. aureus* e cepas de referência provenientes da ATCC pelo sistema Vitek 2.0

Isolado/*ATCC	Bionúmero	Probabilidade (%)	Confiança de identificação
Sa44	010402076363231	93	Muito boa
Sa119	010402073763231	95	Muito boa
Sa468	010402062561231	99	Excelente
Sa487	030002064761231	98	Excelente
Sa696	010402063263231	99	Excelente
Sa710	010402073763231	95	Muito boa
Sa968	010402072663231	94	Muito boa
Sa972	010402033663231	95	Muito boa
Sa981	010102073763231	95	Muito boa
Sa986	010402062761231	99	Excelente
*INCQS013 (ATCC 6538P)	030402077761271	92	Boa
*INCQS015 (ATCC 25923)	010402033763271	96	Excelente
*INCQS358 (ATCC 12600)	010402073763031	90	Boa

Legenda: ATCC: *American Type Culture Collection*.

Fonte: Do autor, 2021.

Neste estudo, o sistema de identificação fenotípica Vitek 2.0 foi capaz de identificar 100% das amostras a nível de espécie, resultado equivalente aos de Funke e Funke-Kissling (2005) e Delmas e colaboradores (2008), que identificaram corretamente 100% das amostras de *S. aureus*, além de 94,5% (n=344) e 93,2% (n=132), respectivamente, do total de amostras analisadas que continham outras espécies. Outro estudo, que analisou amostras clínicas, identificou de forma correta 95,2% (n=20) de amostras de *S. aureus* e 90,4% (n=225) do total das amostras da pesquisa (WALLET et al, 2005). Esses números demonstram que esse sistema é uma ótima alternativa para identificação de cepas de *S. aureus* por apresentar boa acurácia em seus resultados.

A identificação dos microrganismos realizada através do sistema Vitek 2.0 confirmou-se pelos resultados obtidos no método de identificação molecular com alvo no gene 16S rRNA. Segundo a análise, as sequências alinhadas e comparadas com as sequências de *S. aureus* depositadas no banco de dados do GenBank apresentaram similaridade variando de 90,40 a 100% (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das 10 cepas selecionadas com cepas de *S. aureus* depositadas no banco de dados GenBank

Isolado	Seq. ID GenBank	Nível de similaridade (%)
Sa44	Sa_KX225187.1	100
	Sa_KX348313.1	100
	Sa_KC494370.1	100
Sa119	Sa_KX348313.1	100
	Sa_KC494370.1	100
	Sa_KC494365.1	100
Sa468	Sa_MH447012.1	94,63
	Sa_MN198057.1	94,43
	Sa_LC488238.1	94,43
Sa487	Sa_KU922507.1	95,25
	Sa_KC212022.1	95,25
	Sa_KC212021.1	95,25
Sa696	Sa_MH447003.1	96,04
	Sa_MK765026.1	94,82
	Sa_MK503463.1	94,82
Sa710	Sa_MH447032.1	93,90
	Sa_MN198057.1	93,72
	Sa_MK015806.1	93,63
Sa968	Sa_MN198057.1	93,40
	Sa_KT261214.1	92,45
	Sa_MN103606.1	92,36
Sa971	Sa_MK765026.1	94,82
	Sa_MK503463.1	94,82
	Sa_JN084552.1	90,40
Sa981	Sa_MH447003.1	93,19
	Sa_MH447062.1	92,94
	Sa_MN198057.1	92,75
Sa986	Sa_MH447003.1	95,38
	Sa_MH447062.1	95,20
	Sa_MN198057.1	95,14

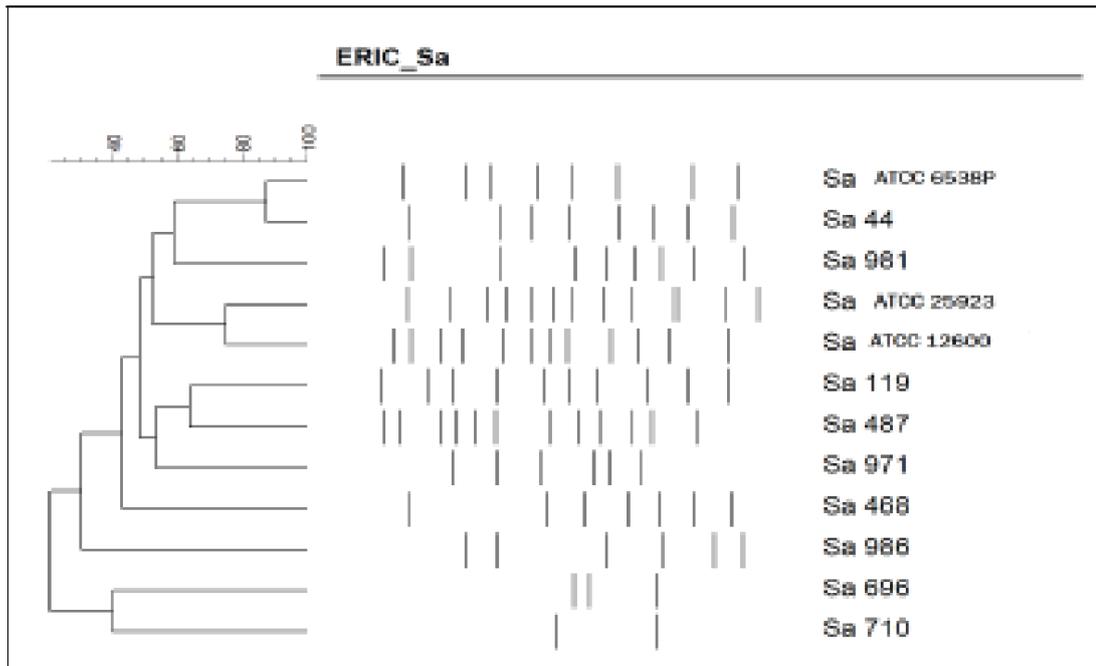
Fonte: Do autor, 2021.

As cepas Sa44 e Sa119 foram as que apresentaram o maior valor de similaridade (100%). A similaridade costuma variar de 90 a 99% em espécies do gênero *Staphylococcus* com base no gene 16S rRNA (GHEBREMEDHIN et al, 2008), que é considerado padrão ouro de identificação das espécies de *Staphylococcus* relacionadas à segurança de alimentos (ALNAKIP et al, 2019). Em um estudo no Brasil que avaliou o nível de identificação de *Staphylococcus* isolados de mastite bovina usando o sequenciamento parcial do gene 16S, verificou-se que as 41 cepas de *S. aureus* analisadas obtiveram 100% de similaridade com as

sequências depositadas no GenBank (LANGE et al, 2015). Outro estudo obteve resultados superiores a 98% de similaridade para várias espécies do gênero (ALNAKIP et al, 2019).

No dendograma construído a partir dos resultados da ERIC-PCR foi observada alta diversidade entre os perfis das cepas (Figura 2).

Figura 2 - Dendograma das 10 cepas selecionadas de *S. aureus* e cepas de referência oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC)



Legenda: Dendograma obtido com base no agrupamento UPGMA e análise de similaridade com cálculo do coeficiente de Dice. Análise realizada utilizando o programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica).

Fonte: Do autor, 2021.

A cepa Sa44, isolada de hambúrguer bovino, apresentou uma similaridade genética de 87,5% em relação à cepa de referência ATCC 6538P, a maior observada nessa análise. Outros estudos que também utilizaram a técnica de ERIC-PCR para avaliação da relação entre as cepas de *S. aureus*, encontraram valores que variaram de 24 a 100% (ARSLAN; MUTLU, 2016; YE et al, 2012). Neste trabalho, o isolado que apresentou maior similaridade genética com a cepa de referência observado no dendograma foi selecionado para a produção do CBR.

4.2 Produção e controle do lote

O lote produzido (n=400) apresentou presença de vácuo em 92,2% dos frascos, sendo considerado satisfatório pelo critério adotado (PRODUÇÃO, 2020). Outros autores conseguiram resultados semelhantes na inspeção de vácuo. Costa e colaboradores (2015)

obtiveram vácuo em 96,5% dos frascos produzidos em matriz queijo, e Brandão e colaboradores nos estudos em matriz queijo (2013a) e carne bovina (2014) observaram 83,3% e 94,2% de vácuo, respectivamente. Em estudos que também utilizaram leite como matriz, os lotes produzidos apresentaram resultados acima de 94% e um desses lotes apresentou vácuo em todos os frascos. Esses resultados demonstram um bom funcionamento do sistema de fechamento utilizado no término do ciclo de liofilização (ROSAS *et al*, 2010; ROSAS, 2018).

O teste de pureza foi realizado em oito frascos do CBR e após a incubação apresentou apenas um tipo de colônia nas placas de TSA demonstrando que não houve contaminação durante a produção.

O lote foi considerado suficientemente homogêneo pelo protocolo harmonizado, com média logarítmica de 6,69 \log_{10} UFC/ ml e com incerteza da homogeneidade de 0,625% (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Resultados das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) do teste de homogeneidade do lote de CBR STA

Item de ensaio	Contagens (UFC/mL)		Log das contagens	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
1	5500000	5400000	6,74	6,73
2	5000000	5800000	6,70	6,76
3	5100000	3400000	6,71	6,53
4	6100000	4900000	6,79	6,69
5	6200000	4400000	6,79	6,64
6	5900000	5700000	6,77	6,76
7	7500000	6500000	6,88	6,81
8	5800000	5800000	6,76	6,76
9	5400000	4900000	6,73	6,69
10	5100000	5600000	6,71	6,75
11	5000000	4300000	6,70	6,63
12	4000000	3800000	6,60	6,58
13	3400000	4900000	6,53	6,69
14	5100000	4400000	6,71	6,64
15	5400000	3800000	6,73	6,58
16	4000000	4800000	6,60	6,68
17	4200000	5300000	6,62	6,72
18	5800000	4600000	6,76	6,66
19	3400000	5400000	6,53	6,73
20	5800000	5700000	6,76	6,76
21	4600000	4000000	6,66	6,60
22	4000000	4400000	6,60	6,64

Legenda: CBR STA - Candidato a Bactéria de Referência de *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Do autor, 2021.

Tabela 4 - Resultado estatístico da avaliação da homogeneidade pelo protocolo harmonizado

Critério analisado	Resultado
DP alvo (σ_p)	0,25
Atende ao critério do DP alvo?	Atende
Dispersos (<i>Outliers</i>)?	Não existem <i>outliers</i>
Média geral	6,692
DP aceitável (σ_{all}^2)	0,006
Variância analítica (s_{an}^2)	0,005
Variância entre amostras (s_{sam}^2)	0,002
“c” crítico	0,011
Incerteza (UFC mL ⁻¹)	0,042 (0,625%)
Resultado final	SH

Legenda: DP - Desvio Padrão; UFC - Unidades Formadoras de Colônias; SH - Suficientemente homogêneo.
 Fonte: Do autor, 2021.

O teste de homogeneidade é um importante requerimento com objetivo de mensurar por amostragem a quantidade presente em cada item e assim, garantir que os itens do lote produzido possuam as mesmas características entre si (ABNT, 2012).

Pesquisas que desenvolveram itens de ensaio e utilizaram na análise estatística o protocolo harmonizado proposto por Thompson e colaboradores (2006) tiveram seus lotes considerados suficientemente homogêneos (COSTA *et al*, 2015; BRANDÃO *et al*, 2013a, ROSAS *et al*, 2010).

O estudo da estabilidade em longa e curta duração do lote produzido foi avaliado pela ANOVA segundo os critérios da ABNT ISO GUIA 35:2012 (Tabela 5) e pela observação de tendência dos valores nos gráficos (Figuras 3 e 4).

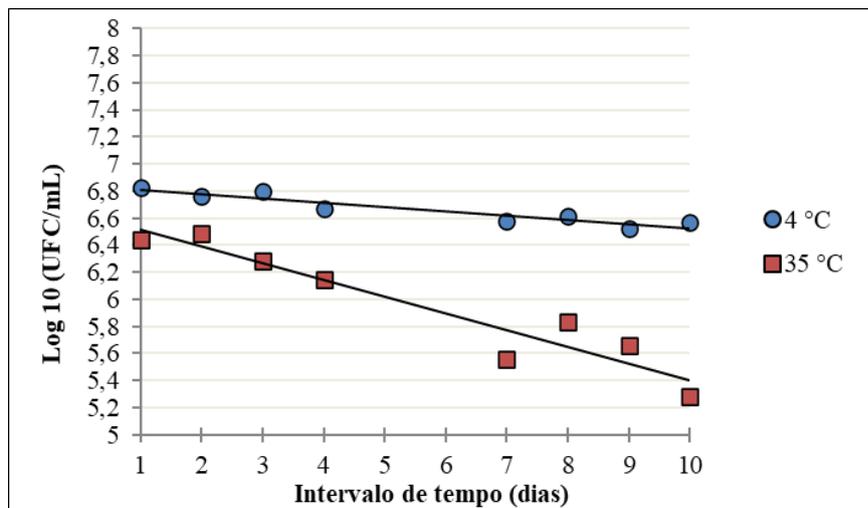
Tabela 5 - Análise estatística do estudo da estabilidade (ANOVA pela regressão linear - ISO GUIA 35) do lote CBR STA

Temperatura (°C)	≤ -70°C	-20 ± 4°C	4 ± 2° C		35 ± 2°C	
Tempo de estudo	12 meses	12 meses	10 dias	4 dias	10 dias	4 dias
Coefficiente angular	0,000391	0,000059	-0,03146	-0,03413	-0,12355	-0,15094
Erro do coeficiente angular	0,000205	0,000264	0,00491	0,01377	0,01624	0,03202
t	2,228139	2,228139	2,44691	3,18245	2,44691	3,18245
Limite inferior (95%)	-0,000066	-0,000529	-0,04348	-0,07794	-0,16329	-,025284
Limite superior (95%)	0,000849	0,000647	-0,01945	0,00968	-0,08381	-0,04905
Incerteza da estabilidade (UFC/mL)	0,0676 (0,9913%)	0,0868 (1,2827%)	0,049 (0,736%)	0,055 (0,813%)	0,162 (2,724%)	0,128 (1,989%)
Coefficiente linear	6,750294	6,758158	6,83905	6,84343	6,64102	6,73948
Resultado	SE	SE	NSE	SE	NSE	NSE

Fonte: Do autor, 2021. Legenda: CBR STA - Candidato a Bactéria de Referência de *Staphylococcus aureus*; UFC - Unidades Formadoras de Colônias; SE - Suficientemente estável; NSE - Não suficientemente estável.

No estudo da estabilidade em curta duração, foram avaliadas as temperaturas de $4 \pm 2^\circ \text{C}$ e $35 \pm 2^\circ \text{C}$ com o objetivo de simular o transporte no período 10 dias, considerando oito intervalos para a análise.

Figura 3 - Estudo da estabilidade em curta duração nas temperaturas de $4 \pm 2^\circ \text{C}$ e $35 \pm 2^\circ \text{C}$ do lote CBR STA durante 10 dias



Legenda: CBR STA - Candidato a Bactéria de Referência de *Staphylococcus aureus*; UFC - Unidades Formadoras de Colônias.

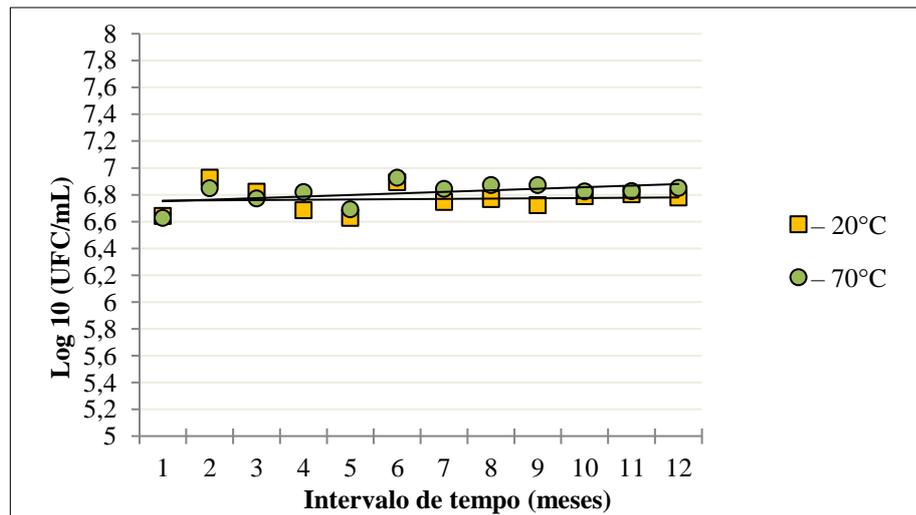
Fonte: Do autor, 2021.

De acordo com o cálculo estatístico utilizado (Anova da regressão linear), os itens analisados em ambas as temperaturas não foram considerados estáveis no período de 10 dias de incubação. Foi possível perceber visível queda da concentração de células a partir do quarto dia, com destaque para a maior temperatura. Em relação aos quatro primeiros dias, tanto a análise estatística, quanto a análise gráfica demonstraram que o lote permaneceu suficientemente estável na temperatura de $4 \pm 2^\circ \text{C}$.

Brandão e colaboradores (2013a) avaliaram a estabilidade dos itens produzidos em 4, 25, 30 e 35°C por quatro dias, e a análise estatística de regressão demonstrou que foram considerados estáveis em todas as temperaturas. Outros estudos apresentaram respostas semelhantes ao nosso em temperaturas acima de 35°C (BRANDÃO *et al*, 2014, COSTA *et al*, 2015, ROSAS *et al*, 2010). Os resultados obtidos no nosso trabalho indicam que o transporte do CBR pode ser realizado em temperaturas $\leq 4^\circ \text{C}$ por até quatro dias.

Foi avaliada a estabilidade do lote nas temperaturas de armazenamento ($-20 \pm 4^\circ \text{C}$) e referência ($\leq -70^\circ \text{C}$). Considerando a análise estatística (Tabela 5) e a análise de tendência do gráfico (Figura 4), o lote foi considerado suficientemente estável nas duas temperaturas estudadas, pelo período de 12 meses.

Figura 4 - Estudo da estabilidade em longa duração nas temperaturas de $-20 \pm 4^\circ \text{C}$ e $\leq -70^\circ \text{C}$ do lote CBR STA durante 12 meses



Legenda: CBR STA - Candidato a Bactéria de Referência de *Staphylococcus aureus*; UFC - Unidades Formadoras de Colônias.

Fonte: Do autor, 2021.

Um estudo que verificou a estabilidade de itens de ensaio em matriz chocolate para pesquisa de *Salmonella* spp. atingiu resultados satisfatórios no período de cinco semanas na

temperatura de armazenamento e no período de 26 semanas na temperatura de referência (SILVA *et al*, 2017).

Costa e colaboradores (2015) obtiveram um lote de itens de ensaio suficientemente estável nas mesmas temperaturas e relacionaram seus resultados ao uso de trealose como crioprotetor adicionado à matriz. O crioprotetor utilizado neste estudo foi a sacarose, e esta, da mesma forma, possui pesquisas em relação à ação crioprotetora frente ao processo de liofilização dos microrganismos, o que promove uma maior estabilidade dos itens em seu armazenamento (BRANDÃO *et al*, 2013b).

5 CONCLUSÃO

Os dados apresentados após a realização das análises de identificação demonstraram que, entre as 10 cepas estudadas, foi selecionada uma cepa bacteriana com características fenotípicas e genotípicas da espécie *Staphylococcus aureus* com maior grau de similaridade a uma cepa de referência dessa espécie para a produção do candidato à bactéria de referência.

Após a produção, o lote CBR STA foi considerado puro, suficientemente homogêneo e estável pelo período de 12 meses nas temperaturas de $-20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ e $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Em relação aos resultados do estudo de estabilidade em curta duração, concluiu-se que o lote analisado pode ser transportado em temperaturas $\leq 4^{\circ}\text{C}$ por até quatro dias.

Considerando os resultados apresentados, o lote se mostrou adequado para utilização como MR em ensaios de análise de alimentos que utilizam *S. aureus* como controle interno, podendo ser um candidato à certificação no futuro.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Gerência Geral de Alimentos. **Perguntas e respostas: padrões microbiológicos**. 2. ed. Brasília, 2020.

ALNAKIP, M. E. *et al.* Molecular characterisation and typing the methicillin resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from raw milk and cheeses in northwest Spain: A mini survey, **International Dairy Journal**, v. 89, p. 68-76, 2019.

ARSLAN, E.; MUTLU, E. G. Genotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey by using ERIC-PCR method. **Pakistan J. Zool.**, v. 48, n. 6, p. 1747-1752, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 30**: materiais de referência – termos e definições selecionados. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio de calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ABNT NBR ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017b.

AYENI, F. A.; ANDERSEN, C.; NØRSKOV-LAURITSEN, N. Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® 2 with partial sequencing of 16S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci, **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 255-259, 2017.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. **Braz. J. Food Technol.**, v. 16, n. 1, p. 73-79, 2013a.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 72, n. 2, p. 124-30, 2013b.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Avaliação de matrizes de carne bovina na produção de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. **Alim.Nutr**, v. 25, n. 1, p. 13-18, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: MS, 2010. 158 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos: informe 2018**. Brasília: MS, 2019a. Disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em: 04 nov. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: seção 1, edição 249, página 96, Brasília, DF, 26 dez. 2019b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN n° 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, edição 249, página 133, Brasília, DF, 26 dez. 2019c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n° 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS 5309-1**: methods for sampling chemical products – part 1: introduction and general principles. Reino Unido: British Standards Institution, 1976.

BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic acids research**, v. 43 (Database issue), n. D1, p. D30–D35, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414350/>. Acesso em 10 dez. 2020.

CHAKRAVORTY, S. *et al.* A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007.

CHUN, J. *et al.* EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.**, p. 2259-2261, 2007.

COSTA, J. C. B. *et al.* Preparo de itens de ensaio de proficiência em matriz queijo para a pesquisa de *Salmonella* spp. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 3, n. 3, p. 11-18, 2015.

DRAEGER, C. L. *et al.* Brazilian Foodborne Disease National Survey: Evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy and practice in public health. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 40, 2019.

DELMAS, J. *et al.* Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 311-313, 2008.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Microbiological Hazards in Fresh Fruits and Vegetables**. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series - Pre-publication version. 2008. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563789_eng.pdf. Acesso em: 04 nov. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad Bug Book. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. 2. ed. [*Staphylococcus aureus*, p. 87], 2012.

- FORSYTHE, S. J. Patógenos de origem alimentar. *Staphylococcus aureus*. In: FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 4, p. 243-246.
- FUNKE, G.; FUNKE-KISLING, P. Performance of the new VITEK 2 GP Card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 84-88, 2005.
- FURLAN, J. P. R. *et al.* Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 39, 2019.
- GHEBREMEDHIN, B. *et al.* Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1019-1025, 2008.
- INMETRO. **NIT-DICLA-61**: requisitos sobre acreditação dos laboratórios de ensaio e dos produtores de material de referência dos centros de recursos biológicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2018.
- JACOB, S. DO C. Laboratório analítico, parte fundamental na avaliação de risco relativo ao consumo de alimentos. In: MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A. L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária**: reflexões e práticas. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. p. 190-195.
- JAVID F. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. **Veterinary World**, v. 11, n. 4, p. 423-430, 2018.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: STACKEBRANT E. and GOOFELLOW M. Eds., **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. New York: John Wiley and Sons, 1991. p. 115-175.
- LANGE, C. C. *et al.* Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing, **Veterinary Microbiology**, v. 176, n 3-4, p. 382-388, 2015.
- LOPES, R. G. A.; SETA, M. H. de. Integração laboratórios - vigilância sanitária: uma revisão. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 5, n. 2, p. 97-105, 2017.
- LPNS. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>. Acesso em: 20 jul. 2020.
- MCCULLOCH, J. A.; MAMIZUCA, E. M. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. cap. 20, p. 179-188.
- MELO, E. S. *et al.* Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **Pubvet**, v. 12, n. 10, p. 131, 2018.
- MORAIS, O. M. G. Princípios da garantia da qualidade na otimização das operações analíticas realizadas em laboratórios. In: MARINS, B. R.; TANCREDI, R. C. P.; GEMAL, A.

L. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. 288 p.

ODUMERU, J.A. *et al.* Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. **J Clin Microbiol.**, v. 37, p. 944-9, 1999.

O'HARA, C. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram-negative *bacilli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 147-162, 2005.

OTTO, T. D. *et al.* ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 3, p. 861-871, 2008.

PRODUÇÃO e Controle de Itens de Ensaio de Microbiologia em Matriz de Alimentos. *In*: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 6. (65.1030.028). [2020].

RANJBAR, R. *et al.* Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. **Iranian journal of pathology**, v. 12, n. 1, p. 25–34, 2017.

ROSAS, C. O. *et al.* Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.

ROSAS, C. O. **Desenvolvimento de Materiais de Referência Microbiológicos Certificados por métodos fenotípicos e moleculares**. 2018. 186 p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.

ROSAS, C. O. *et al.* Microbiological reference material (bacterial and fungal domains): Definition, production rules, use and need for establishment in Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 22, 2019.

RUDOLPH, W. W. *et al.* Comparison of VITEK 2, MALDI-TOF MS, 16S rRNA gene sequencing, and whole-genome sequencing for identification of *Roseomonas mucosa*, **Microbial Pathogenesis**, v. 134, 2019.

SILVA, M. L. C. *et al.* Desenvolvimento de itens de ensaio de proficiência para pesquisa de *Salmonella* spp. em matriz chocolate. **Vigil. Sanit. Debate**, v. 5, n. 2, p. 106-112, 2017.

SULAIMAN, I. M. *et al.* Rapid selection of *Staphylococcus aureus* and related species isolated from food, environment, cosmetics, a medical device, and clinical samples using the VITEK MS Microbial Identification System. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 4, p. 1135-1143, 2018.

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

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2012. 263 p.

- TURNER, S. *et al.* Investigating deep phylogenetic relationships among Cyanobacteria and Plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327-338, 1999.
- VERSALOV, J; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.
- WALLET, F. *et al.* Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of Gram-Positive and Gram-Negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4402-4406, 2005.
- WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S Ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Geneva: WHO Press, 2015.
- YE, Y. *et al.* The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotic susceptibility testing, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus–Polymerase Chain Reaction, and Random Amplified Polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 2, p. 168-171, 2012.
- YOON, S.H. *et al.* Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 67, n. 9, p. 1613-1617, 2017.