



SAÚDE

PREFEITURA MUNICIPAL DE SAÚDE
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
INSTITUTO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, VIGILÂNCIA DE
ZOONOSES E INSPEÇÃO AGROPECUÁRIA
COORDENADORIA GERAL DE INOVAÇÃO, PROJETOS, PESQUISA
E EDUCAÇÃO SANITÁRIA

Victor Hugo Ribeiro Jayme

Avaliação de metodologia alternativa para análise de *Escherichia coli* no LASP/IVISA-RIO.

Rio de Janeiro
2024

Victor Hugo Ribeiro Jayme

Avaliação de metodologia alternativa para análise de *Escherichia coli* no LASP/IVISA-RIO.

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado ao Programa Uniprofissional de Residência, do Instituto de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e Inspeção Agropecuária, na Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientador(a): M.e. Pedro Campinho Belsito

Aprovado em: 21/02/2024

Banca Examinadora

M.e. Pedro Campinho Belsito
Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e Inspeção Agropecuária
(IVISA-Rio)

M.e. Rafaela de Carvalho Pereira da Silva
Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e Inspeção Agropecuária
(IVISA-Rio)

Dra. Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Rio de Janeiro
2024

RESUMO

As doenças de transmissão hídrica e alimentar são enfermidades veiculadas por alimentos e água contaminados, tendo como causadores diversos patógenos e uma sintomatologia variada, de quadros brandos aos potencialmente fatais. A contaminação frequentemente se dá pela manipulação inadequada do alimento, muitas vezes passível de ser evitada por boas práticas de manipulação e produção. Concomitante às boas práticas é importante manter o monitoramento da circulação de microrganismos potencialmente deletérios à saúde humana, tarefa realizada pelo Laboratório Municipal de Saúde Pública do Instituto de Vigilância Sanitária, Inspeção Agropecuária e Zoonoses. Esse trabalho propõe uma reestruturação da metodologia de caracterização e contagem para *Escherichia coli*, bactéria da microbiota entérica de animais de sangue quente e, em alguns casos, causadora de patologias no homem. A modificação técnica visa o encurtamento do tempo de resposta e corte de gastos para amostras com valores abaixo do preconizado para *E.coli* pela legislação, utilizando o meio de cultura *Fluorocult®* para auxiliar a metodologia de bancada e mantendo a celeridade na análise, assim como no método automatizado para contagem de bactérias. O tempo de resposta para vigilância epidemiológica e investigação de surtos é imprescindível, por isso é necessário a implementação de uma metodologia célere para além do sistema TEMPO®, uma vez que a técnica de tubos múltiplos requer muitos dias para sua conclusão. Ao se lançar mão das mudanças propostas nesse estudo se obteve resultados promissores que indicam a viabilidade de uma futura validação e implementação da técnica modificada no setor de controle microbiológico de produtos do IVISA-RIO. Porém, para ocorrer a efetiva utilização da metodologia testada se faz necessário a realização de estudos mais complexos.

Palavras-chave: Microbiologia; Vigilância Sanitária; Segurança de Alimentos; *Escherichia coli*; *Fluorocult®*; NMP; Miniaturizado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Análise com as modificações propostas	19
Figura 2-	Ilustração explicativa das fases da técnica modificada.....	21
Gráfico 1-	Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTHA, Brasil, 2013 a 2022.....	9
Gráfico 2-	Proporção de amostras que pararam na triagem.....	29
Gráfico 3-	Análises interrompidas apenas observando a combinação de tubos LST....	29
Gráfico 4-	Compatibilidade de resultados das amostras que foram para fase de confirmação.....	30
Gráfico 5-	Compatibilidade de resultados das amostras que foram para fase de confirmação.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparação entre os métodos de análise de <i>E. coli</i>	14
Tabela 2-	Limites microbiológicos para <i>E. coli</i>	15
Tabela 3-	Sequências de tubos de LST que representariam contagem de <10NMP/g.....	18
Tabela 4-	Análise descritiva das amostras utilizadas no estudo.....	22
Tabela 5-	Dados de amostras com análise interrompida na triagem e intervalos de confiança compatíveis.....	24
Tabela 6-	Amostras com intervalos de confiança compatíveis após irem para fase de confirmação pelo primeiro critério de inclusão.....	26
Tabela 7-	Amostras com resultados de triagem inesperados.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Graus Celsius
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
DAEC	<i>Escherichia coli</i> aderente difusa
EAggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroaggregativa
EC	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
IN	Instrução Normativa
IVISA	Instituto de Vigilância Sanitária, Inspeção Agropecuária e Zoonoses
LASP	Laboratório Municipal de Saúde Pública
L-EMB	Ágar Levine Eosina Azul de Metíleno
LST	Lauril Sulfato Triptose
µl	Microlitros
ML	Mililitros
MUG	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide hydrate
NMP	Número Mais Provável
SSP	Solução Salina Peptonada Tamponada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Radiação Ultravioleta
VM-VP	Vermelho de Metila-Voges Proskauer

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Cifrão
=	Igual
±	Mais ou Menos
≥	Maior ou igual que
®	Marca Registrada
<	Menor que
≤	Menor ou igual que
-	Negativo
%	Porcentagem
+	Positivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	JUSTIFICATIVA	9
3.	OBJETIVOS	10
3.1.	Objetivos gerais	10
3.2.	Objetivo específico	10
4.	REFERENCIAL TEÓRICO	10
4.1.	Caracterização do Agente.....	10
4.2.	Técnicas de Enumeração de <i>E. coli</i>	12
4.3.	Enquadramento e Limites.....	14
5.	METODOLOGIA	15
5.1.	Amostragem.....	15
5.2.	Coleta, transporte e preparo das amostras.....	16
5.3.	Modificação da técnica de tubos múltiplos.....	17
5.4.	Critérios de Exclusão e Inclusão para a fase de confirmação.....	20
6.	RESULTADOS	21
6.1.	Variáveis.....	21
6.2.	Resultados e discussão.....	24
7.	CONCLUSÃO	31
8.	REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

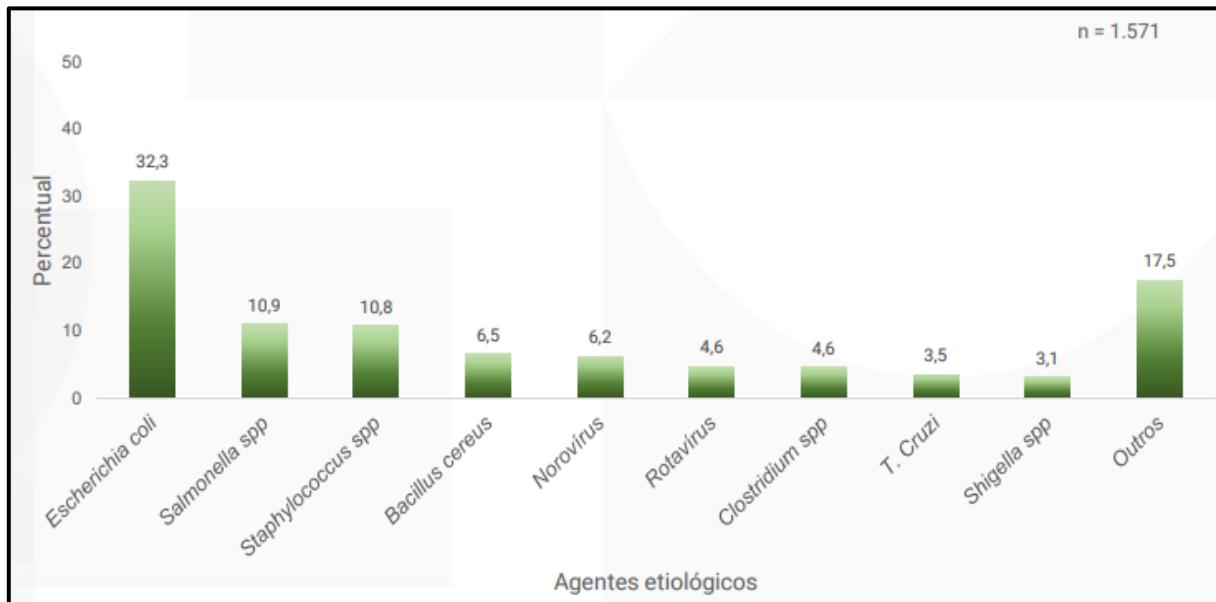
As doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são enfermidades que tem como veiculadores os alimentos e água contaminados e consumidos pela população. Nos últimos anos, as refeições feitas fora de casa estão cada vez mais comuns, tornando a segurança do alimento cada vez mais imprescindível. As DTHA comumente são de caráter infecioso, podendo ter como causadores vírus, bactérias, protozoários, príons e toxinas. Uma importante causa de contaminação da comida é a higienização incorreta das mãos de quem a manipula, devido a capacidade de sobrevivência de alguns patógenos por longos períodos sobre superfícies e roupas. Definidos como qualquer pessoa que possa a vir a entrar em contato com o alimento nas diversas etapas da cadeia produtiva, os manipuladores são uma das principais fontes de contaminação dos produtos comestíveis (BRASIL, 2023; SANTOS *et al.*, 2020; TEIXEIRA, 2020).

Lavar e higienizar bem as mãos e utensílios é fundamental para minimizar a veiculação de microrganismos potencialmente perigosos para os seres humanos, assim como boas práticas de manipulação e fabricação (ALVES, EMILAURA; GIARETTA; COSTA, 2012; OMS, 2020; TORRES *et al.*, 2020).

Além das medidas citadas acima, conhecer o perfil microbiológico do alimento é fundamental para realizar a vigilância epidemiológica e avaliar o risco para saúde pública, proporcionando um produto seguro para a população através das análises microbiológicas na qual identifica-se o microrganismo que podem estar no alimento (WALKER; COELHO, 2013). Existe uma grande variedade de bactérias que causam doenças alimentares, com diferentes períodos de incubação e diversos sintomas, perpassando pelos mais leves até uma sintomatologia mais grave. Esses patógenos estão presentes em diversas matrizes alimentares, possuem vários fatores de virulência e podem levar desde enfermidades agudas até as crônicas (FORSYTHE *et al.*, 2013).

No Brasil, no período de 2007 até 2020 foram notificadas por ano mais de 600 surtos de DTHA por ano, com envolvimento de 156.691 doentes, com mais de 20.000 hospitalizações e 152 óbitos (BRASIL, 2020). Em um levantamento de dados realizado pelo ministério da saúde (Gráfico 1) aponta a *Escherichia coli* como a principal envolvida em surtos em que foi possível identificar o agente etiológico, causando três vezes mais surtos do que a segunda posição, a *Salmonella spp* (BRASIL, 2023).

Gráfico 1- Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTHA, Brasil, 2013 a 2022.



Fonte: Sinan/SVS/Ministério da Saúde

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente o sistema automatizado é o principal método de análise microbiológica no laboratório, apesar de sua alta eficiência e rapidez é possível de apresentar falhas mecânicas ou defeitos, por se tratar de um sistema automático, ou até mesmo desabastecimento de *kits* de análise ou possíveis *recalls*. Quando há algum empecilho na utilização do aparelho da BIOMÉRIEUX® a alternativa que se recorre para realizar as análises é a metodologia clássica.

Este trabalho tem como justificativa propor uma adaptação na técnica tradicional de análise microbiológica para *E.coli*, uma vez que o método de tubos múltiplos é demasiadamente demorado e trabalhoso.

O ajuste na técnica de tubos múltiplos atenderá aos critérios de pesquisa estabelecidos pela legislação atual para a pesquisa de *E.coli*, proporcionando resultados equivalentes a metodologia original, quando se fala em análises fiscais baseadas na instrução normativa Nº 161 de 2022, em um prazo muito menor, em torno de 24-48 horas, sendo uma alternativa melhor para se usar em detrimento da metodologia original (BRASIL, 2022a). Apesar da necessidade de se utilizar um meio cromogênico e fluorogênico, o qual possui um valor oneroso, a adequação proporciona uma celeridade nas análises de bancada para *E. coli*. Uma vez que o laboratório é responsável pela análise microbiológica de amostras provenientes investigações

de surtos e análise de amostras da coleta de programas de monitoramento, o tempo de resposta se torna um critério imprescindível na hora de eleger uma metodologia (LEITE; FRANCO, 2006). Para além disso, a modificação poupa o uso de vários outros meios e reagentes para provas bioquímicas utilizados na metodologia tradicional, o que por consequência irá diminuir os custos das análises.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral propor uma adaptação da metodologia clássica de enumeração de *E.coli* para o setor de controle microbiológico de produtos do Instituto de Vigilância Sanitária, Inspeção Agropecuária e Zoonoses da cidade do Rio de Janeiro (IVISA-RIO).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente estudo tem como objetivos específicos avaliar a eficiência e a precisão da modificação proposta na metodologia de bancada de análise microbiológica, comparar dados desta inovação na técnica com a metodologia automatizada do sistema TEMPO®, diminuir custos e encurtar o tempo de resposta nas análises de *E.coli*, quando na impossibilidade de se lançar mão do sistema automatizado.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE

Neste trabalho o objeto de estudo é uma espécie do grupo dos coliformes totais, caracterizado por bastonetes gram-negativos e não formadores de esporos, mais especificamente a *Escherichia coli*, que pode ser móvel ou não e oxidase negativa. Esses são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo essa constituída por dezenas de gêneros e

espécies, no entanto apenas cerca de 20 espécies são pertencentes ao grupo de coliformes totais e *E. coli* (LEITE; FRANCO, 2006).

Caracterizado pela capacidade de fermentar a lactose com a produção de gás e/ou ácido à 35°C, os coliformes estão subdividido em bactérias de origem do trato gastrointestinal de animais de sangue quente e as de origem não entérica (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018). Os métodos clássicos de análise e contagem de coliformes totais utilizam a capacidade de fermentar a lactose e produzir gás para a determinação de sua contagem, porém os métodos mais atuais utilizam a detecção direta da atividade enzimática por meio da mudança de coloração de meios altamente específicos, sendo alguns meios capazes de detectar inclusive espécies específicas, como a *E. coli*. (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

O subgrupo denominado Coliformes Termotolerantes, são capazes de fermentar a lactose com produção de gás a temperaturas mais elevadas, entre 44,5 e 45,5°C. Este grupo foi inicialmente chamado de Coliformes Fecais, pois originalmente era utilizado para denominar bactérias de origem gastrointestinal. Todavia, hoje sabe-se que existem bactérias de origem não entérica que fazem parte desse grupo, levando esta nomenclatura ao desuso (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

A *E. coli* pertencente ao subgrupo de termotolerantes, possui como habitat natural o trato gastrointestinal de animais de sangue quente, porém não sendo essa a única forma de contaminação dos alimentos. Para a diferenciação dessa espécie para os demais coliformes realiza-se o perfil bioquímico, obtido através das provas de Indol, Vermelho de Metila, Citrato e Voges Proskauer (IMViC) ou por métodos mais modernos como a detecção da atividade enzimática da β-D-glucuronidase sobre o substrato 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide hydrate (4-MUG) gerando fluorescência, tal qual o meio utilizado neste trabalho (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

A *E. coli* possui linhagens não patogênicas e patogênicas, essas últimas responsáveis por causar infecções no sistema urinário, sistema digestivo e meningites. Atualmente um dos principais causadores de infecções do trato urinário são as cepas uropatogênicas (MENEZES *et al.*, 2017), porém as patogênicas e que tem importância na transmissão por alimentos são as cepas denominadas de enteropatogênicas ou diarreogênicas (AGUIAR, 2019). Existem seis principais patotipos de *E. coli*, são eles: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAggEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (KNÖBL *et al.*, 2011). A ETEC é uma das principais causadoras de diarreia osmótica em mamíferos, aderindo as microvilosidades do intestino delgado e produzindo toxinas, a EPEC é um importante agente

de disenterias em crianças de países em desenvolvimento e a EHEC é responsável por quadros de diarreia aquosa e sanguinolenta, podendo evoluir para o óbito, tendo como principal sorotipo isolado o O157:H7 (AGUIAR, 2019; KNÖBL *et al.*, 2011; ROSA; BARROS; SANTOS, 2016). A EHEC ainda pode ser responsável pela produção da *Shiga-Like Toxin* que induz a lesões em células epiteliais e que tem tropismo pelas células dos glomérulos renais, resultando na destruição dos glomérulos e causando insuficiência renal aguda e síndrome hemolítica urêmica (SHU) (ROSA; BARROS; SANTOS, 2016).

4.2. TÉCNICAS DE ENUMERAÇÃO DE *E. coli*.

O setor de microbiologia de Laboratório de Saúde Pública (LASP) utiliza com mais frequência duas técnicas para a detecção e contagem de *E.coli* , sendo uma delas por meio de número mais provável (NMP) a partir da técnica de tubos múltiplos (SILVA, M. P.; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006) e pelo método NMP automatizado do sistema TEMPO® da BIOMÉRIEUX®. A técnica de tubos múltiplos é uma técnica clássica de contagem de bactérias, entretanto possui algumas limitações, como a quantidade de meios e reagentes necessários para se realizar a mesma, o número de vidrarias necessárias, número de estufas, placas, dificuldade de controle logísticos, probabilidade de falhas na realização da técnica e a possibilidade de demandar até 10 dias para a sua conclusão, tornando-se muito laboriosa e de alto custo.

A técnica de contagem automatizada do sistema TEMPO® também é baseada em determinação de número mais provável, porém utiliza uma carta com dezenas de poços contendo cada um deles reagentes liofilizados para fazer essa estimativa. Ela se inicia com a pesagem de 25g da amostra e posterior homogeneização da amostra com 225ml de SSP 0,1%. Após isso, 1ml dessa solução é transferido para um vidro contendo meio de cultura específico para o microrganismo, meio esse que vem liofilizado e que precisa ser hidratado com 3ml de água estéril antes de ser acrescido da amostra. O vidro contendo amostra mais meio são colocados em um suporte específico onde também se encontra a carta de múltiplos poços e que possui um tubo que fica imerso no líquido do vidro. Essa carta é cadastrada no sistema por códigos de barra e vinculada ao número da amostra que irá receber. Depois o suporte com o vidro contendo amostra e a carta são colocados em uma máquina que por meio de diferença de pressão faz a amostra subir pelo tubo da carta e preencher todos os poços e por fim sela o tubo com calor para isolar a amostra. A carta vai para estufa onde é incubada à 35°C por 24h e depois vai para outra máquina que faz a leitura dos poços, dando o resultado em UFC/g de amostra. A técnica é confiável e rápida, entretanto requer pessoal altamente treinado e é susceptível a

problemas operacionais e ação de interferentes provenientes da matriz alimentícia, sendo interessante um método alternativo para casos emergenciais que necessitem de uma celeridade para o resultado (CIROLINI, 2012).

Uma outra forma de pesquisar e enumerar esses microrganismos é a técnica de NMP rápida e miniaturizada desenvolvida na Universidade Federal Fluminense, na qual é utilizado *eppendorfs* com o meio *Fluorocult®* no lugar de tubos de ensaio com LST para a realização da técnica e incubação das bactérias alvo. São retirados 25g da amostra e homogeneizadas com SSP 0,1% para posterior realização das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), após isso as 100 μ l das diluições adicionados em *eppendorfs* contendo 900 μ l de meio cromogênico e fluorogênico, formando uma tríade para cada uma das diluições seriadas utilizadas. Após 24h os tubos que apresentarem mudança de coloração para verde azulado são expostos a luz UV, onde positivos apresentam fluorescência e para confirmação de *E.coli* é adicionado o reagente de *Kovacs*, que ao formar um anel vermelho indica a presença de indol. Para terminar se compara o número de positivos com a tabela de *Mac Crady* para se ter o conhecimento do número mais provável (Merck, 2002 modificado por Franco, R.M. e Mantilla, S.P.S., 2004). Essa metodologia também é uma adaptação da técnica clássica e gera respostas para a pesquisa de *E. coli* de forma célere.

A técnica de tubos múltiplos convencional para enumeração de *E.coli* se inicia com o preparo da amostra a ser analisada, a pesagem de 25g do alimento em questão e depois ocorre a diluição em 225ml de solução salina peptonada, ao qual é submetida a uma homogeneização no *Smasher®*. Dessa forma se obtém a primeira diluição de 1:10, em seguida, é retirado uma alíquota de 1ml e transferida para tubo de ensaio contendo 9ml de SSP 0,1%, 1ml desse tubo é transferido para outro com a mesma quantidade e meio, finalizando assim as 3 diluições: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Podem ser realizadas mais diluições de acordo com o tipo de alimento ou até mesmo o nível de contaminação do alimento. Cada diluição dessa gera uma tríade de tubos de ensaio com tubos de durham, contendo 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose e 1ml da diluição correspondente, que são incubados por $\pm 24/48$ horas à ± 35 °C. Após o período de incubação, os tubos positivos na etapa presuntiva (turvação e produção de gás dentro dos microtubos) têm uma alçada retirada e transferida para tubos com caldo *E.coli* (caldo EC), tubos esses que serão incubados por ± 24 h à 44,5°C. Havendo crescimento e, novamente, a produção de gás, segue-se para as etapas de confirmação de *E.coli*, primeiramente semeando em placas de Petri com Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB). Nesse meio, colônias que apresentarem crescimento típico, são coletadas para a semeadura em Ágar nutritivo, após o crescimento das UFCs, começa a série bioquímica. A bioquímica de *E.coli* envolve a utilização de 3 meios, Ágar

Citrato de Simons a 35°C/96h (-), Caldo VM-VP a 35°C/ 96h (VP – e VM +) e Caldo Triptona 1% a 35°C/24h que será adicionado o reagente de *Kovacs*, reagente esse que confirma ou não a presença de Indol (+ ou -). Por fim, observa-se quantos tubos positivaram para *E. coli* na confirmação bioquímica e se faz a comparação com a tabela de *McCrady* e, obtendo assim, a quantificação de *E.coli* (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

A seguir, uma tabela comparativa entre os métodos de análise (Tabela 1), onde é possível ver de forma mais ilustrativa a diferença entre os métodos citados anteriormente.

Tabela 1- Comparação entre os métodos de análise de *E. coli*.

Técnica	Custo	Complexidade	Tempo de Análise
SISTEMA TEMPO®	MUITO ALTO	ALTA	MUITO BAIXO
TUBOS MÚLTIPLOS CONVENCIONAL	ALTO	MUITO ALTA	MUITO ALTO
NMP RÁPIDA MINIATURIZADO	MÉDIO	BAIXA	BAIXO
ADAPTAÇÃO PROPOSTA NESSE ESTUDO	BAIXO	BAIXA	BAIXO

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A tabela apresentada anteriormente foi produzida comparando as variáveis da disposição com as da técnica de tubos múltiplos convencional. Nenhuma técnica tem baixo custo ou é pouco complexa quando analisada individualmente, porém ao se comparar com uma metodologia específica é possível inferir qual é mais cara, mais complexa e até mesmo comparar o tempo de análise entre elas.

4.3 ENQUADRAMENTO E LIMITES

As legislações atuais usadas para classificar e julgar os resultados são a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 724/2022 e a Instrução Normativa (IN) nº 161/2022, as quais estabelecem e dispõem sobre o padrão microbiológico dos alimentos. A IN divide os alimentos em classes e categorias específicas (que podem ir de A até J) e define os limites microbiológicos (*m* e *M*) de cada categoria específica (BRASIL, 2022a). A RDC dispõe como se interpretam os resultado a partir das análises, se os valores encontrados estiverem abaixo de *m* o alimento é classificado como satisfatório com qualidade aceitável, se estiver entre *m* e *M* o alimento é

classificado com satisfatório com a qualidade intermediária e se estiver acima de M ele é classificado como insatisfatório com qualidade inaceitável (BRASIL, 2022b).

Todas as amostras usadas no experimento estão classificadas, de acordo com o Anexo I da Instrução Normativa, como 21 e se subdividindo entre as categorias específicas A, B, C e E. Sendo A alimentos prontos para consumo preparados com uso de calor, B alimentos prontos para consumo com produtos de origem animal elaborados sem o uso de calor, C alimentos prontos para o consumo preparados sem o emprego de calor e exclusivamente de origem vegetal e E doces e sobremesas. A primeira categoria tem um limite (M) menor que as demais (Tabela 2), pois é a onde se encontra alimentos preparados prontos para o consumo, elaborados com emprego de calor e consequentemente deve ser menos permissível ao definir os limites.

Tabela 2: Limites microbiológicos para *E. coli*.

Categoría	Microrganismo	m	M
21A	<i>E. coli</i>	10	20
21B	<i>E. coli</i>	10	10^2
21C	<i>E. coli</i>	10	10^2
21E	<i>E. coli</i>	10	10^2

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

5. METODOLOGIA

5.1. AMOSTRAGEM

Para calcular o número amostral da pesquisa foi utilizado uma calculadora virtual disponível na *internet*, desenvolvida pelo doutor José Roberto Pereira Lauris, professor da Universidade de São Paulo e que atua em pesquisa e desenvolvimento de tecnologia em informática para aplicação em saúde, essa ferramenta foi consultada de forma gratuita e *online*. O cálculo foi baseado na média de amostras mensais recebidas pelo LASP para análise microbiológica, em torno de 600 alimentos a serem analisados, com um nível de confiabilidade de 95% e uma taxa de erro aceita de até 5%. A calculadora inferiu que o N da pesquisa deveria ser de 83 amostras (JOSÉ ROBERTO PEREIRA LAURIS *et al.*, 2023). No entanto, ao longo do projeto foi realizado a análise de 88 amostras e após falhas técnicas algumas foram perdidas, sobrando 80 amostras para se trabalhar os dados.

5.2. COLETA, TRANSPORTE E PREPARO DAS AMOSTRAS

Os alimentos analisados são provenientes das coletas para análise fiscal de amostra indicativa realizadas rotineiramente pelo IVISA-RIO. Essas são obtidas diariamente, por técnicos treinados, em estabelecimentos da cidade do Rio de Janeiro e chegam ao laboratório sob refrigeração em caixas isotérmicas com gelo reciclável. Após o processo de recepção e enquadramento dentro das classificações da legislação vigente, as amostras são processadas e submetidas à análise de *E.coli*, que atualmente é feita por meio do sistema TEMPO®, dentre outras que são exigidas pela instrução normativa Nº 161 de 2022, de acordo com seu enquadramento (BRASIL, 2022a).

O experimento ocorreu durante o mês de novembro de 2023 e o número de amostras foi dividido por quatro, número esse correspondente ao número de semanas do mês, gerando assim entre 20-25 amostras por semana. As análises com a metodologia proposta pelo estudo foram sempre realizadas nas segundas-feiras, com as 20-25 primeiras amostras que chegassem na sexta-feira e que ficaram armazenados em temperaturas entre 2 e 4 graus celsius após ser retirado os 25g para análise oficial. Tornando as amostras aleatórias, já que não era possível predizer quais amostras seriam coletadas pelos técnicos e assim permitiria já ter o resultado do TEMPO® em mãos. Esse dia foi escolhido para que não houvesse interferência na rotina do laboratório, uma vez que ele tem como foco principal a análise fiscal e não a pesquisa.

Segunda pela manhã é o turno do laboratório com a menor demanda, pois normalmente não há coletas aos finais de semana e na segunda há apenas as etapas de pesquisa de *Salmonella* spp. para ser realizado. A parte inicial do estudo (seleção e preparo das amostras, identificação dos tubos, pesagem, homogeneização, diluições e semeadura) é a mais demorada e laboriosa, então só poderia ser feita quando o laboratório estivesse com menor demanda, sendo esse horário o turno da manhã do primeiro dia útil da semana.

Os alimentos que chegam ao laboratório, em sua grande maioria, são alimentos perecíveis prontos para consumo e de acordo com as normas vigentes esses tipos de alimentos precisam passar por análise fiscal em até vinte e quatro horas após a coleta. Por terem prazos curtos de análise eles acabam sendo coletados em amostra única, por serem de rápida deterioração não há tempo hábil para contestação de resultados com análise de contraprova ou amostra de testemunho (BRASIL, 1969, 1977).

A legislação discorre que o prazo máximo de consumo dos alimentos preparados e

conservados sob refrigeração a temperatura de 4°C ou inferior é de no máximo cinco dias, assim como o prazo de validade descrito no termo de apreensão de amostra para análise (TAAA) lavrado no ato da coleta (BRASIL, 2004). Por esse motivo nenhum alimento foi analisado para esse experimento após esse prazo e apesar de ser maior do que estabelecido para realização de análise fiscal de perecíveis, ainda está dentro da validade e as análises do trabalho foram realizadas no menor prazo no qual se podia e sem atrapalhar análises oficiais.

5.3. MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS

Os alimentos classificados como 21A, 21B, 21C e 21D e 21E possuem como padrão microbiológico (m) para *E.coli* igual a 10 NMP/g de alimento (BRASIL, 2022a). Utilizando-se da técnica convencional, se faz necessário realizar todas as etapas descritas anteriormente para todos os tubos que apresentarem crescimento e gás no LST e/ou caldo EC, para saber o número exato de bactérias e se estas são realmente *E.coli*.

A primeira alteração na metodologia tradicional que foi feita nesse estudo é a interrupção da análise para as combinações de tubos de LST positivos que, já nessa fase, indicariam uma contagem <10 NMP/g, realizando assim uma triagem técnica. Padrões de tubos que ao final indicassem valores abaixo de 10 (Tabela 3), mesmo que esses sejam propriamente *E.coli*, seriam descartados e se findaria a pesquisa pelo possível patógeno. Assim seria economizado o uso de até 7 insumos, sendo eles meios, caldos e reagentes utilizados para saber se essa quantidade diminuta é mesmo a *E.coli* ou não, poupando dinheiro, recursos humanos do laboratório e tempo, uma vez que seria possível fechar os resultados dos <10NMP/g com 48h. O laudo seria emitido sem alterações em relação aos emitidos atualmente, pois o sistema TEMPO® já emite os resultados de amostras seguras, referente ao microrganismo pesquisado nesse estudo, como <10NMP/g. Mesmo que o alimento possua carga zero ou até mesmo presença, mas em números abaixo do m da IN nº 161/2022, que até seria possível precisar, uma vez que a tabela de NMP/g abrange números abaixo de <10NMP/g, o laudo final ainda seria emitido da mesma forma (<10NMP/g) já que não é do interesse do laboratório precisar de tal forma o número da contagem.

Tabela 3- Sequências de tubos de LST que representariam contagem de <10NMP/g.

Combinação de tubos Positivos			NMP/g
0	0	0	<3,0
0	0	1	3,0
0	1	0	3,0
0	1	1	6,1
0	2	0	6,2
0	3	0	9,4
1	0	0	3,6
1	0	1	7,2
1	1	0	7,4
2	0	0	9,2

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A segunda adaptação na técnica foi a semeadura de um *eppendorf* contendo 900 μ l de *Fluorocult®* (MERCK, 110620) com 100 μ l da diluição 10⁻¹, incubado pelo mesmo tempo e temperatura dos tubos contendo LST (Figura 1), baseado, em partes, na técnica desenvolvida na UFF (Merck, 2002 modificado por Franco, R.M. e Mantilla, S.P.S., 2004). Essa etapa seria um presuntivo de presença ou ausência para *Escherichia coli*, uma vez que o meio não apresente fluorescência sob luz UV na diluição mais concentrada da metodologia, indicaria a ausência de *E.coli* e consequentemente não havendo presença nos tubos com maior concentração bacteriana provavelmente não teria nos que possuem menor concentração. A proposta inicial seria que amostras sem fluorescência na triagem tivessem suas análises interrompidas, porém algumas amostras que não apresentaram fluorescência tiveram as análises continuadas, pois tinham muitos tubos LST positivos e resultado prévio no TEMPO® como ≥ 10 NMP/g, o levou a continuação para confirmar.

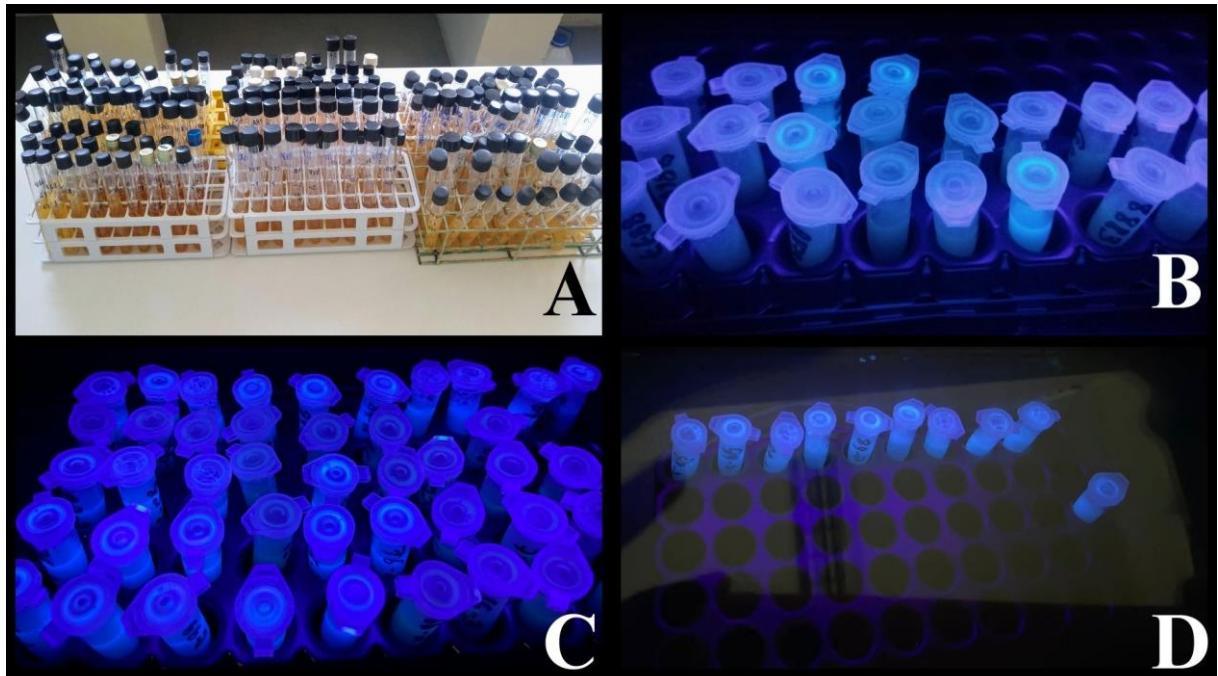
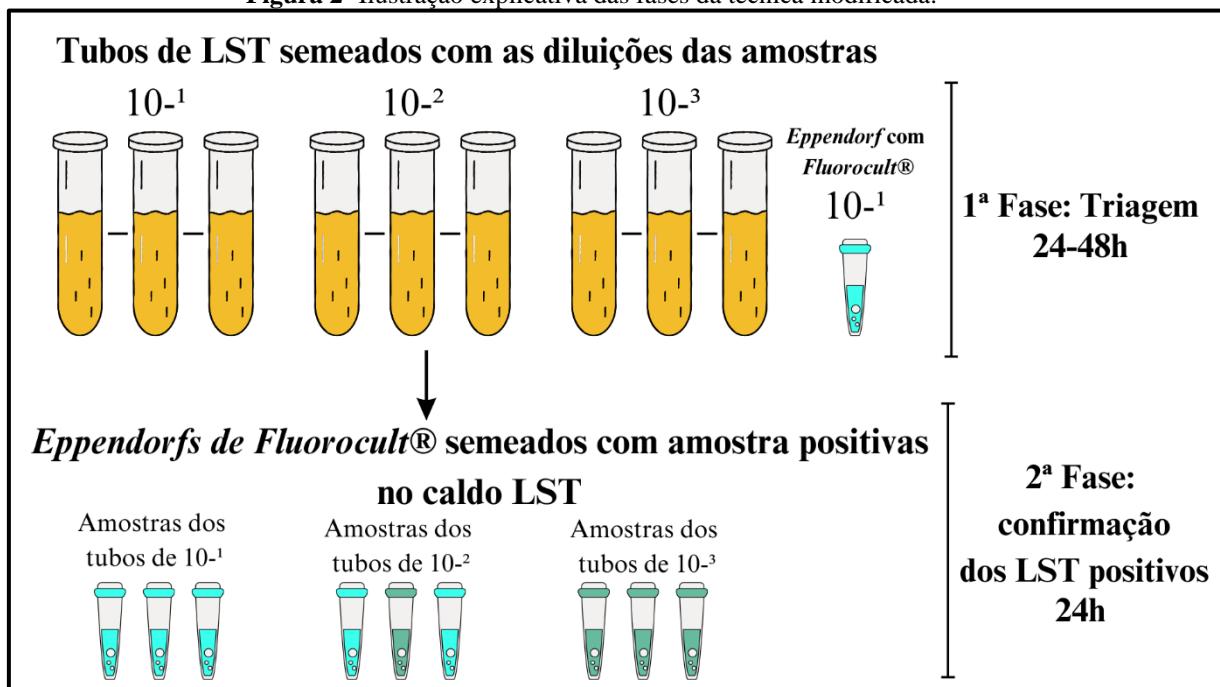


Figura 1- Análise com as modificações propostas. Acervo pessoal, 2023. **(A)** Fase de triagem de um dia de análise com em média 200 tubos de caldo LST. **(B)** Eppendorfs com 900 μ l de meio fluorogênico e 100 μ l de amostra a 10⁻¹ na fase de triagem. Na imagem é possível perceber quais amostras apresentam positivas pela fluorescência do meio e pela formação de um halo fluorescente na tampa do microtubo. **(C)** Etapa de confirmação de amostras que passaram da primeira fase do experimento. A maioria das amostras desse dia acabou apresentando 9 tubos de LST positivos, então foram semeados 9 microtubos com o *Fluorocult®*. **(D)** Alguns tubos positivos para a presença de *E. coli* provenientes da etapa de confirmação.

A terceira modificação na técnica é que amostras com presença de fluorescência na triagem ou muitos LST positivos com resultado do TEMPO® constando ≥ 10 NMP/g, teriam uma alçada de cada tubo de LST positivo semeada em um *eppendorf* contendo 1000 μ l de *Fluorocult®* (MERCK, 110620) (Figura 1), substituindo passagem para o caldo EC e a bioquímica (Figura 2). Assim, seria possível avaliar se essa modificação era capaz de substituir essas duas etapas da técnica de tubos múltiplos.

Figura 2- Ilustração explicativa das fases da técnica modificada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Todos os dias nos quais ocorreram análises das amostras pela técnica adaptada para esse estudo, foi realizado análise com uma amostra controle com a ATCC de *E.coli* NCTC® 12241 (WDCM 00013). Vinte e cinco mililitros SSP foram inoculados com 500µl de uma suspensão bacteriana de densidade 0,5 da escala de Mcfarland (correspondente na de 1x10⁸ UFC/ml), baseado em estudos controle tal qual NEVES (2010).

5.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO PARA A FASE DE CONFIRMAÇÃO

Todas as amostras do estudo foram submetidas a fase de triagem, LST e o *eppendorf* contendo 900µl de *Fluorocult®* e 100µl de amostra com diluição de 10⁻¹, porém nem todas as amostras foram submetidas a fase de confirmação da técnica proposta. A maior parte ficou apenas na fase de triagem pois se encaixava nos critérios de exclusão para ser eliminado da próxima etapa.

O primeiro critério de exclusão, como já dito antes nas modificações propostas na metodologia, é não possuir uma combinação de tubos de LST positivos que apresentem resultados ≥10NMP/g (Tabela 3) e que apresentaram resultados <10NMP/g na contagem do sistema automatizado, apresentando fluorescência ou não.

O segundo critério de exclusão são amostras com combinações de LST que poderiam

ser $\geq 10\text{NMP/g}$, no entanto não apresentaram fluorescência na triagem e apresentaram resultados no TEMPO $< 10\text{NMP/g}$.

Os critérios de inclusão são as características que tornam as amostras elegíveis para seguir na etapa de confirmação da técnica modificada, que substitui o caldo EC por *eppendorfs* com meio fluorogênico e nos permite ter a combinação de tubos para comparar com a tabela de NMP e obtenção da contagem mais precisa para então comparar com os resultados previamente obtidos pelo sistema.

O primeiro são as amostras que apresentam combinação de LST que represente uma possível contagem de $\geq 10\text{NMP/g}$, com ou sem fluorescência e que o resultado do TEMPO® seja $\geq 10\text{NMP/g}$.

O segundo critério é ter um padrão no LST que poderia ser uma contagem $\geq 10\text{NMP/g}$, com a presença de fluorescência, porém que apresente resultado no tempo $< 10\text{NMP/g}$.

6. RESULTADOS

6.1. VARIÁVEIS

As principais variáveis analisadas nesse estudo foram o enquadramento das amostras de acordo com a legislação vigente, alteração de cor e presença de fluorescência do *Fluorocult®* na fase de triagem, combinação de tubos positivos no LST e no caldo EC (para amostras que seguiram adiante), resultado de NMP/g dado pelo sistema TEMPO® e resultado da análise da técnica proposta, sendo nesses dois últimos ainda utilizado os intervalos de confiança para fins de comparação. A seguir uma tabela descrevendo essas variáveis:

Tabela 4- Análise descritiva das amostras utilizadas no estudo.

Variáveis		Descrição	TOTAL DE AMOSTRAS (%)
			88 (100)
	21A	Alimentos preparados prontos para o consumo, elaborados com emprego de calor	48 (54,5)
Enquadramento das amostras de acordo com a RDC nº 724/22 E IN nº 161/22 (anexo I) da ANVISA	21B	Alimentos preparados prontos para o consumo contendo produtos de origem animal, elaborados sem emprego de calor, consumidos crus	8 (9,1)
	21C	Alimentos preparados prontos para o consumo contendo exclusivamente produtos de origem vegetal, elaborados sem emprego de calor	20 (22,7)
	21E	Doces e sobremesas	12 (14,0)
			88 (100)
Amostras Perdidas		Amostras descartadas por ajustes na metodologia e/ou erro humano	8 (9,0)
			80 (100)
Mudança de cor do Fluorocult® no Eppendorf	NÃO	Sem presença de coliformes totais	43 (53,8)
	SIM	Presença de coliformes totais	37 (46,3)
			80 (100)
Fluorescência do Fluorocult® no Eppendorf	NÃO	Sem presença de E. coli	72 (90,0)
	SIM	Presença de E. coli	8 (10,0)
			80 (100)
Contagem do sistema TEMPO®	Menor valor	<10 NMP/g	63 (78,7)
	Maior valor	$3,7 \times 10^3$ NMP/g	1 (1,2)
			15 (100)
Contagem da técnica proposta	Menor valor	<3 NMP/g	4 (26,6)
	Maior valor	>1100 NMP/g	1 (6,6)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Como mostrado na tabela anterior é possível observar que a maioria dos alimentos que chegaram até o LASP, durante o experimento, estão enquadrados na categoria 21A, isso decorre devido ao fato da grande maioria dos estabelecimentos visitados pelas equipes de coleta serem restaurantes e bares que vendem a comida pronta para o consumo aos seus clientes. A categoria 21C também apresenta uma parte significativa das amostras do estudo, visto que nessa classificação se encaixam as saladas e alimentos folhosos no geral, alimentos esses que por serem elaborados sem o emprego de calor podem oferecer grande risco sanitário e por isso são constantemente coletados para análise. Já a 21B e a 21E são as amostras menos expressivas

nesse estudo, na 21B se encaixam principalmente alguns pratos de origem asiática, *carpaccios* e *ceviches* e a 21E são as sobremesas, que são alimentos menos frequentes na hora da coleta. Apenas uma das classificações da categoria 21 da IN nº161 não esteve presente nesse estudo, a 21D, sendo essa a classificação de sanduiches e esses alimentos não foram coletados em função do programa de monitoramento realizado no período.

As amostras indicadas como amostras descartadas (Tabela 4), oito amostras, são amostras que foram perdidas devido as falhas técnicas e por isso não fizeram parte do estudo final.

Na tabela quatro pode-se observar que um total de 43 amostras apresentaram mudança de cor na triagem. Dentro dessas amostras estão todos os alimentos que no sistema automatizado apresentaram resultados satisfatórios com qualidade intermediária ($\geq 10\text{NMP/g}$) e insatisfatório com qualidade inaceitável ($\geq 20\text{NMP/g}$). Observando os números é possível ver que de todos os ensaios apenas 8 deles apresentaram fluorescência na etapa de triagem, correspondendo a apenas 10% do total, porém nem todas as amostras que apresentaram resultados $\geq 10\text{ NMP/g}$ estão contidas nesse grupo.

Os resultados obtidos pelo TEMPO® se mantiveram entre uma faixa de $<10\text{NMP/g}$ e $3,7 \times 10^3$, onde 63 amostras obtiveram o resultado de menor contagem e apenas uma alcançou o maior valor encontrado no estudo. Desses amostras satisfatórias com qualidade aceitável, 42 delas tiveram suas análises encerradas apenas observando o padrão de tubos positivos em LST quando submetidas a metodologia testada, pois todas elas apresentaram padrões que não passariam de uma contagem $\geq 10\text{NMP/g}$ (Tabela 3). Mesmo que esses positivos no LST fossem *E.coli*, seriam contagens aceitáveis de acordo com a legislação e não poderia gerar nenhum tipo sanção direta por parte do IVISA, então não se justificaria seguir a análise dessas amostras. As outras 21 amostras $<10\text{NMP/g}$ apresentaram padrões no LST que seriam compatíveis com contagens $\geq 10\text{NMP/g}$, no entanto nenhuma delas apresentou fluorescência na triagem e o resultado do TEMPO® indicava que elas estavam com uma baixa contagem, não prosseguiram na análise.

Dentre os resultados de NMP/g obtidos pelas amostras que seguiram para etapa de confirmação na metodologia proposta, a menor contagem encontrada foi $<3\text{NMP/g}$ com quatro amostras apresentando esse valor e o maior foi $>1100\text{ NMP/g}$, que vem a ser o limite superior da enumeração da tabela de NMP.

Os intervalos de confiança da tabela de NMP e do sistema TEMPO® também foram variáveis levadas em conta na hora de analisar os resultados. Elas além da estimativa de NMP/g apresentam dados como o limite superior e o limite inferior das estimativas de NMP, é nessa

faixa entre esses limites que se encontra o número verdadeiro da contagem em 95% das vezes, porém sendo esse um número desconhecido (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018). Esses intervalos de confiança foram comparados para avaliar se, mesmo que com resultados diferentes nas duas técnicas, os intervalos de confiança se sobreponham em algum momento, mostrando que apesar de não serem valores iguais ainda estão próximos. No entanto, esses valores só foram utilizados nas amostras que apresentaram resultados satisfatórios com qualidade intermediária e insatisfatórios com qualidade inaceitável no TEMPO® e amostras que se apresentaram positivas na triagem ou que apresentaram alguma divergência com o resultado que se tinha em mãos.

6.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 63 amostras negativas tanto no sistema de análise do laboratório e na metodologia testada já foram expostas enquanto se discutia as variáveis. A partir daqui o foco será as 17 amostras com valores maior ou igual a 10NMP/g no sistema automatizado e/ou na técnica alvo do estudo ou que apresentaram algum tipo de divergência nos resultados. Desses 15 tiveram continuidade na análise do método proposto, não parando apenas análise na triagem, pois se encaixavam nos critérios de inclusão para dar prosseguimento.

Duas amostras (1 e 2) classificadas como 21C apresentaram resultados um pouco diferente da máquina (Tabela 5). Apesar do resultado inesperado, não foi dado continuidade na análise (fase de confirmação) delas pois de qualquer forma os resultados dariam <10NMP/g na tabela.

Tabela 5- Dados de amostras com análise interrompida na triagem e intervalos de confiança compatíveis

Nº	Positivos no LST	Resultado da Tabela NMP/g	Intervalo de confiança da Tabela	Resultado do TEMPO®	Intervalo de confiança do TEMPO®		
			MIN.	MÁX.	MIN.	MÁX.	
1	0-0-0	<3,0 NMP/g	S/L*	9,5	10NMP/g	1,5	73
2	2-0-0	9,2NMP/g	1,4	38	10NMP/g	1,5	73

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

*S/L: Sem Limite.

As duas apresentaram na análise do TEMPO® resultados iguais (10NMP/g), resultados esses que classificariam as amostras como satisfatórias com qualidade aceitável (BRASIL,

2022a). No entanto, no LST apresentaram resultados um pouco diferentes. Na primeira não houve crescimento e produção de gás em nenhum tubo, o que corresponde na tabela uma contagem de <3NMP/g, mas ainda assim sua classificação de acordo com a legislação não mudaria. Quando se compara os intervalos de confiança das duas técnicas tem uma faixa de valores que os resultados se sobrepõem e o limite máximo apontado pela tabela (9,5NMP/g) é bem próximo do valor indicado pelo tempo.

A segunda amostra apresentou 2 tubos de LST em concentração de 10^{-1} positivos e por se encaixar no primeiro critério de exclusão não foi dado continuidade. Por ter ido para etapa de confirmação não podemos saber quais desses tubos são ou não positivos para *E.coli*, mas mesmo sem ir confirmar só temos 3 possibilidades para essa amostra: ela ter todos os tubos negativos na confirmação (0-0-0), apresentar apenas um tubo positivo (1-0-0) ou confirmar os dois tubos (2-0-0). Na primeira alternativa seria o mesmo caso da amostra 1, onde não temos tubos positivos. Na segunda a contagem de acordo com a tabela seria de 3,6NMP/g e os intervalos de confiança estariam entre 0,17 NMP/g e 18 NMP/g, ainda sim apresentando sobreposição com os resultados do método comparado. A terceira alternativa, a que foi colocada na tabela, é que os 2 tubos dessem positivo, sendo assim o resultado seria bem próximo do que já era conhecido pelo TEMPO®, com intervalos de confiança se sobrepondo ainda mais e conferindo maior paridade entre os dados. Apesar de não serem exatamente iguais, não é possível dizer que são valores completamente divergentes, pois como os intervalos de confiança se sobrepõem há a possibilidade de serem compatíveis, uma vez que não é possível precisar o número exato da contagem com essas técnicas.

Quinze amostras se enquadram em algum dos dois critérios de inclusão, propostos anteriormente, para irem para a fase de confirmação. Onze delas (da amostra 3 até 13) foram consideradas como resultados compatíveis quando se avalia os intervalos de confiança (Tabela 6), apesar de não serem exatamente iguais. A amostra dez tem a classificação 21A e as demais estão divididas entre 21B e 21C, possuindo assim limites diferentes (Tabela 2) da décima amostra.

Tabela 6- Amostras com intervalos de confiança compatíveis após irem para fase de confirmação pelo primeiro critério de inclusão.

Nº	Positivos no LST	Confirmação (<i>Fluorocult®</i>)	Resultado da Tabela (NMP/g) ***	Intervalo de confiança da Tabela	Resultado do TEMPO® (NMP/g)	Intervalo de confiança do TEMPO®
3	3-3-3	0-0-0	<3,0	S/L**	9,5	10
4	3-3-3	0-0-0	<3,0	S/L**	9,5	10
5	3-3-3	1-0-0	3,6	0,17	18	10
6	3-3-0	2-0-0	9,2	1,4	38	21
7	3-3-3	2-0-0	9,2	1,4	38	21
8	3-3-3	3-0-0	23	4,6	94	21
9	3-3-3	3-0-0	23	4,6	94	92
10*	3-3-3	3-1-0	43	9	180	10
11	3-3-3	3-2-0	93	18	420	21
12	3-3-3	3-2-0	93	18	420	45
13	3-3-3	3-3-3	>1100	420	S/L**	$3,4 \times 10^3$
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.						

*: Única amostra 21A.

**S/L: Sem Limite.

***: Esse resultado é baseado na combinação de tubos positivos de *Fluorocult®* na etapa de confirmação.

Dessas amostras, duas (6 e 7) mudam de classificações de acordo com qual resultado se observe, do TEMPO® ou da técnica testada, saindo de satisfatórias com qualidade aceitável para satisfatórias com qualidade intermediária, que apesar de mudarem, são amostras satisfatórias que não apresentariam grandes riscos e nem gerariam autuações por parte da IVISA para com os estabelecimentos, mas pode gerar uma visita de fiscalização quando os fiscais forem entregar o laudo.

As amostras 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12 e 13 apesar de resultados não exatamente iguais se mantêm na mesma classificação independente de qual método de análise se observe, os 3 primeiros sendo satisfatórios com qualidade aceitável independente do resultado, as amostras 8, 9, 11 e 12 com resultados satisfatórios com qualidade intermediária e o último apresentando-se como insatisfatório com qualidade inaceitável. Apesar das amostras terem resultados diferentes todas elas têm intervalos de confiança que se sobrepõem quando se compara as técnicas, o que pode indicar que não são resultados totalmente divergentes, visto que não se pode precisar a contagem (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018). Objetivando uma melhor avaliação dos resultados seria necessário análises estatísticas, como por exemplo o cálculo de escore-z para avaliar a compatibilidade dos resultados obtidos, assim como feito por Massih (2016).

Por fim, apenas uma dessas amostras mudaria a classificação de forma significativa de

acordo com qual metodologia observasse o resultado (amostra 10) e um dos fatores relacionados a isso é o curto intervalo entre o m e M dos alimentos 21 A, pois são alimentos preparados com uso de calor (BRASIL, 2022a). A amostra saiu de um resultado satisfatório com qualidade aceitável (TEMPO®) para um resultado insatisfatório com qualidade inaceitável e mesmo ela possui uma grande sobreposição de intervalos de confiança, então não se pode afirmar que um dos dois resultados seja falso, já que não é possível saber o número exato da contagem por se tratar de uma estimativa (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

Os últimos 4 resultados a serem discutidos são de amostras que na triagem apresentaram características inesperadas (Tabela 7). Onde duas (14 e 16) se enquadram no primeiro critério de inclusão para prosseguir as análises e duas (15 e 17) se encaixam no segundo critério de inclusão.

Tabela 7- Amostras com resultados de triagem inesperados.

Nº	Positivos no LST	Confirmação (<i>Fluorocult®</i>)	Resultado da Tabela (NMP/g)	Intervalo de confiança da Tabela	Resultado do TEMPO® (NMP/g)	Intervalo de confiança do TEMPO®		
14	3-0-0	0-0-0	<3	S/L*	9,5	10	1,4	71
15	3-3-1	0-0-0	<3	S/L*	9,5	<10	- **	- **
16	3-1-1	3-1-0	43	9	180	3,7X10 ³	2X10 ³	6,9X10 ³
17	3-3-3	3-2-0	93	18	420	<10	- **	- **

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

* S/L: Sem Limite.

**: O sistema TEMPO® não define intervalo de confiança quando uma amostra tem o resultado de <10 NMP/g

As amostras 14 (21B) e 15 (21C), apesar de apresentarem contagens baixas no TEMPO® apresentaram fluorescência na triagem. É possível explicar presença de fluorescência mesmo em baixas contagens pelo fato do meio, nesta etapa, ser utilizado apenas como um indicador qualitativo e não quantitativo e mesmo que em pequenas concentrações ainda pode existir um quantitativo de células bacterianas capazes de gerar a fluorescência (CHANTARASIRI *et al.*, 2015; MERCK, [s. d.]). Contudo, ainda são amostras satisfatórias, pelo TEMPO® com qualidade intermediária e pela metodologia alternativa com qualidade aceitável, nas duas técnicas e com resultados muito próximos quando comparado os intervalos de confiança.

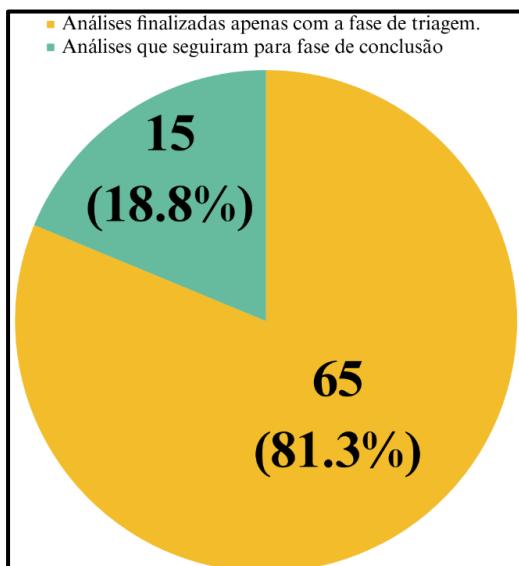
A número 16 não apresentou fluorescência na triagem, mesmo apresentando contagem insatisfatória nos dois métodos de análise. Em um primeiro momento, quando se comparou o resultado da triagem com o resultado do sistema automatizado, achou-se que poderia se tratar

de uma cepa de *E. coli* que não produzisse a enzima β -D-glucuronidase. Apesar de ser uma porcentagem pequena, entre 4-6%, algumas cepas patogênicas não produzem essa proteína, inclusive estirpes de *E. coli* O157:H7 podem não apresentar produção da mesma (MANAFI, 2000). Porém, ao seguir com a amostra para as etapas de confirmação e ela apresentar fluorescência, mudou-se a hipótese para uma provável falha na realização da técnica. Talvez a alíquota colocada no *eppendorf* da triagem não tivesse células o suficiente para gerar fluorescência no meio, o que pode ocorrer por erro na hora da homogeneização dos sacos ou pela demora entre a etapa homogeneização, semeadura dos tubos com LST e a distribuição das alíquotas para o *eppendorf*, o que causaria a decantação das bactérias no saco de homogeneização. Como mostrado por Massih (2016), erros no manuseio de amostras estão entre as principais causas de resultados discrepantes do esperado em análises microbiológicas, podendo chegar até 8% delas. Esses desacertos podem ocorrer na utilização de técnicas de homogeneização inadequadas, momento da análise e condições de armazenamento inapropriados e até misturas de amostras. Ainda que não tenha apresentado resultados próximos e que os intervalos de confiança das técnicas não se aproximem em momento algum, a amostra dezesseis apresenta a constância de resultados insatisfatórios, o que para o IVISA vai gerar os mesmos tipos de ações e sansões sobre o estabelecimento.

A análise 17 no resultado do equipamento se mostrou com resultado satisfatório com qualidade aceitável e na técnica proposta se apresentou insatisfatório com qualidade inaceitável, inclusive apresentando fluorescência na triagem, apesar disso não se pode comparar os intervalos de confiança, pois quando o TEMPO® indica uma amostra <10NMP/g ele não define esses valores do intervalo. O mais provável é que essa amostra tenha sofrido contaminação cruzada dentro do laboratório, sendo essa uma das causas de falsos negativos ou falsos positivos, além de erros humanos e problemas técnicos (ABDEL MASSIH *et al.*, 2016). Esse erro pode explicar os resultados diferentes entre sistema automatizado e a técnica testada.

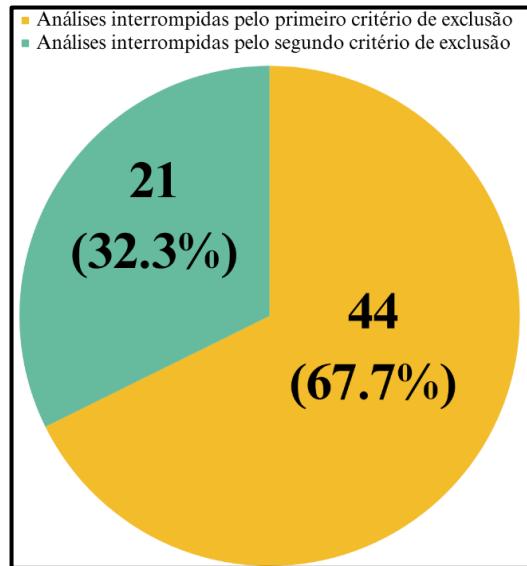
A maioria das amostras recebidas pelo setor de microbiologia do LASP-IVISA em novembro foram amostras satisfatórias e 65 dessas amostras o resultado pode ser obtido apenas observando o resultado da triagem (Gráfico 2), onde 63 o resultado foi <10NMP/g nas duas análises e 2 obtiveram esse resultado apenas na metodologia proposta e no TEMPO® o resultado foi de 10NMP/g. Na metodologia proposta esse tipo de amostra, em mais de 60% dos casos, consegue ser identificada apenas na triagem observando apenas as combinações de LST positivos (Gráfico 3).

Gráfico 2- Proporção de amostras que pararam na triagem.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

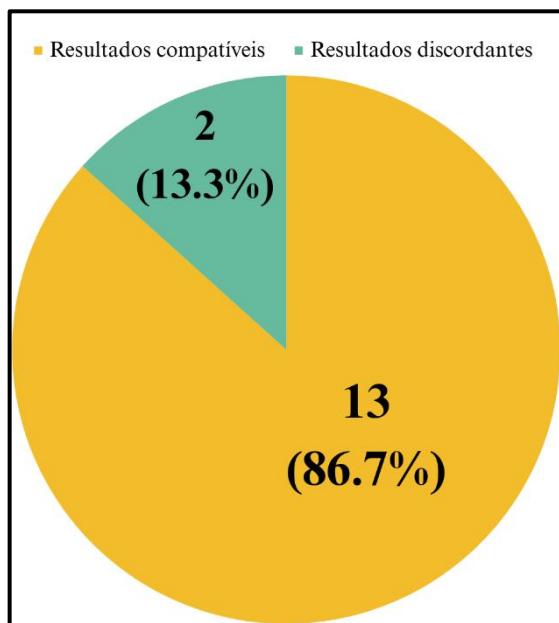
Gráfico 3- Análises interrompidas apenas observando a combinação de tubos LST.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

O estudo contou com 80 (100%) amostras analisadas, das quais 15 (18,8%) se encaixavam nos critérios de inclusão definidos para avançar com as amostras para a confirmação (Gráfico 2). Considerando resultados compatíveis entre os métodos analisados como resultados que, independentemente do método de análise, mantiveram a classificação final do alimento igual (Satisfatório ou Insatisfatório), mesmo que algumas vezes alterne entre qualidade aceitável ou intermediária e alimentos que tiveram contagens não exatamente iguais, porém apresentaram intervalos de confiança com grande sobreposição. Assim, de 15 amostras que avançaram, 13 apresentaram contagens consideradas como compatíveis com o resultado previamente obtido do TEMPO® e somente 2 amostras (10 e 17) se mostraram com resultados discordantes entre as análises (Gráfico 4). Entretanto, a amostra número 10 ainda assim possuí uma considerável sobreposição entre os intervalos de confiança das duas análises, mostrando que ainda sim pode representar resultados compatíveis, uma vez que é impossível precisar a enumeração com absoluta certeza.

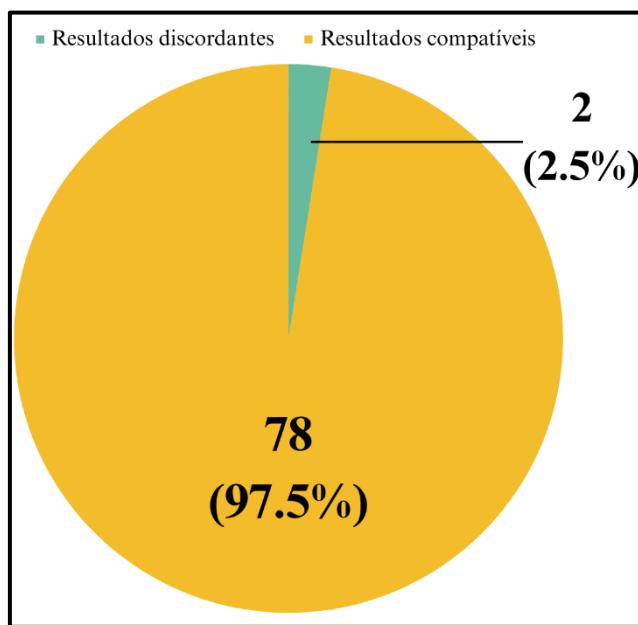
Gráfico 4- Compatibilidade de resultados das amostras que foram para fase de confirmação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

De todos os alimentos analisados no estudo, 78 deles apresentaram resultados considerados compatíveis entre as técnicas ao se avaliar e comparar as variáveis observadas, representando resultados promissores de mais de 95% de compatibilidade dos resultados entre as técnicas estudadas (Gráfico 5). Contudo, o número amostral da pesquisa foi baseado na quantidade média de amostras recebidas por mês no setor de microbiologia e isso gerou um número muito pequeno de amostras para usar modelos bioestatísticos. Eles poderiam fornecer análises muito mais precisas e confiáveis dos resultados, inclusive fornecendo o grau de compatibilidade fidedigno entre as técnicas, porém esses modelos necessitam de grandes números amostrais para gerar uma análise com número confiável e isso não foi possível devido ao curto período de realização do experimento.

Gráfico 5- Compatibilidade de resultados das amostras que foram para fase de confirmação.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Apesar do alto valor do meio cromogênico e fluorogênico, nesse trabalho usa-se 900 μ l do meio por amostra negativa e amostras que seguiram para as etapas de confirmação usou-se 1000 μ l por tubo positivo de LST, o que daria no máximo 9ml por amostra tornando a sua realização muito econômica em comparação à confirmação de *E.coli* em tubos múltiplos (SILVA, Neusely da *et al.*, 2018).

7. CONCLUSÃO

A implementação dessas mudanças geraria uma grande economia em gastos e principalmente na diminuição do tempo de resposta comparado a técnica de tubos múltiplos convencional, usada na impossibilidade de utilizar o TEMPO®. Como mostrado, anteriormente, mais de 80% das amostras podem ter sua análise encerrada apenas implementando a primeira fase de triagem, composta das duas primeiras adaptações propostas. Os alimentos que necessitarem ir para etapa de confirmação também teriam sua análise findada com maior celeridade, pois esta etapa ao utilizar de meio *Fluorocult®* torna-se mais simples de ser realizada.

Para a técnica usada nesse projeto ser implementada em um laboratório de análise fiscal são necessários estudos mais complexos com grandes números amostrais e uso de métodos

estatísticos que comprovem sua confiabilidade e uma possível validação no laboratório, estudos esses que podem ser realizados na forma de futuros projetos de mestrado e/ou doutorado realizados dentro da instituição. Esse trabalho mostrou a viabilidade das modificações propostas e deu os primeiros passos para pesquisas mais avançadas com intuito de validação e implementação das modificações propostas para a técnica.

REFERÊNCIAS

ABDEL MASSIH, M. *et al.* Analytical performances of food microbiology laboratories - critical analysis of 7 years of proficiency testing results. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 346–354, fev. 2016.

AGUIAR, M. L. **Ocorrência de diarreias associadas as Escherichia coli diarréogenicas.** 2019. 47 f. São José do Rio Preto, 2019. Disponível em:
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/08/1010032/tcc-e-coli-diarreiogenicas-morgana-clr-sjrp.pdf>. Acesso em: 13 maio 2023.

ALVES, E.; GIARETTA, A. G.; COSTA, F. M. HIGIENE PESSOAL DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS DOS SHOPPINGS CENTERS DA REGIÃO DA GRANDE FLORIANÓPOLIS. [S. l.], v. 3, n. 1, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2020. **Situação Epidemiológica.** Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/situacao-epidemiologica/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 2 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. INSTRUÇÃO NORMATIVA-IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, p. 22, 1 jul. 2022a. Disponível em:
http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2. Acesso em: 29 maio 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº 724. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União:** v. nº126, 1 jul. 2022b. Disponível em:
http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_724_2022_.pdf/33c61081-4f32-43c2-9105-c318fa6069ce. Acesso em: 21 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. LEI Nº 6.437 DE 20 DE AGOSTO DE 1977. CONFIGURA INFRAÇÕES À LEGISLAÇÃO SANITÁRIA FEDERAL, ESTABELECE AS SANÇÕES RESPECTIVAS, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. **Diário Oficial da União de de 24/08/1977:** p. pág. nº 11145, 24 ago. 1977. Disponível em:
https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6437.htm. Acesso em: 30 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO Nº 216. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, p. 46, 15 set. 2004. Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/res0216_15_09_2004.html. Acesso em: 21 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. DECRETO-LEI Nº 986 DE 21 DE OUTUBRO DE 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União de 21/10/1969, P. 8935:** p. P. 8935, 21 out. 1969. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/del0986.htm. Acesso em: 30 jan. 2024.

BRASIL. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no Brasil - Informe 2023 — Ministério da Saúde.** [S. l.: s. n.], 26 jun. 2023. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023/view>. Acesso em: 2 fev. 2024.

CHANTARASIRI, A. *et al.* Comparative evaluation of LMX culture medium and modified LMX culture medium for detecting Escherichia coli in water. **Bulletin of Health, Science and Technology**, [S. l.], v. 13, p. 1–7, 12 fev. 2015.

CIROLINI, A. **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU E PROCESSADO**. 2012. 141 f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

FORSYTHE, S. J. *et al.* **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2^a edição. [S. l.]: Artmed, 2013.

JOSÉ ROBERTO PEREIRA LAURIS *et al.* Cálculo Amostral. 2023. **Site de Estatística-USP**. [Estatística]. Disponível em: http://estatistica.bauru.usp.br/calcularamostral/ta_ic_proporcao.php. Acesso em: 24 ago. 2023.

KNÖBL, T. *et al.* Serogroups and virulence genes of Escherichia coli isolated from psittacine birds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 916–921, out. 2011.

LEITE, A. M. D. O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e Escherichia coli em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 80–83, 2006.

MANAFI, M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 205–218, 25 set. 2000.

MENEZES, R. A. D. O. *et al.* Uropathogens prevalence in public health laboratory Macapá - AP, 2009 - 2012. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S. l.], v. 49, n. 1, 2017. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.21877/2448-3877.201600127>. Acesso em: 13 maio 2023.

MERCK. READYCULT COLIFORMS 100 | 101298. [s. d.]. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Coliforms-100,MDA_CHEM-101298#documentation. Acesso em: 18 mar. 2024.

NEVES, F. D. *et al.* Avaliação da microinfiltração bacteriológica em implantes hexágono externo com diferentes superfícies de parafuso. **Revista Odontológica do Brasil Central**, [S. l.], v. 19, n. 49, 1 ago. 2010. Disponível em: <https://www.robrac.org.br/seer/index.php/ROBRAC/article/view/452>. Acesso em: 27 maio 2023.

OMS. Inocuidad de los alimentos. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 30 maio 2023.

ROSA, J. L.; BARROS, R. F.; SANTOS, M. de O. CARACTERÍSTICAS DA ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC). [S. l.], 2016.

SANTOS, A. de O. dos *et al.* AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE EQUIPAMENTOS, UTENSÍLIOS E MÃOS DE MANIPULADORES DE UM SERVIÇO

DE NUTRIÇÃO E DIETÉTICA. **Archives of Veterinary Science**, [S. l.], v. v.25, n. n.3, p. 74-84, 2020.

SILVA, N. da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5^a edição. Brasil: Blucher, 2018.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 26, p. 352–359, jun. 2006.

TEIXEIRA, S. C. ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA Em cooperação com UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA. [S. l.], 2020.

TORRES, F. P. da S. *et al.* ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS EM SUPERMERCADOS. **Hig. aliment**, [S. l.], v. V. 34 (291):, n. e1039, p. 10, dez. 2020.

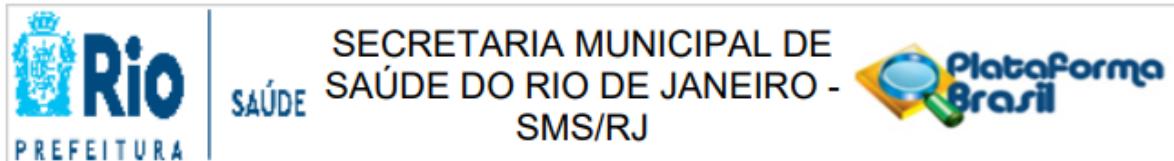
WALKER, J. F.; COELHO, A. F. S. Pesquisa de micro-organismos indicadores de condições higienicossanitárias, no processamento e comercialização de gelados comestíveis. [S. l.], v. 27, 2013.

ANEXO I - Tabela de número mais provável

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blogdgett, 2010).

ANEXO II - Parecer Consustanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de metodologia alternativa para análise de E. coli no LASP/IVISA-RIO.

Pesquisador: VICTOR HUGO RIBEIRO JAYME

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71259623.5.0000.5279

Instituição Proponente: RIO DE JANEIRO SEC MUNICIPAL DE SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.417.675

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Outubro de 2023

Assinado por:
Salesia Felipe de Oliveira
(Coordenador(a))

ANEXO III- Ata de defesa do Trabalho de Conclusão de Residência



PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
INSTITUTO MUNICIPAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, VIGILÂNCIA DE ZOONOSES E DE INSPEÇÃO AGROPECUÁRIA
COORDENAÇÃO GERAL DE INOVAÇÃO, PROJETOS, PESQUISA E EDUCAÇÃO SANITÁRIA
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA PROFISSIONAL E MULTIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA E VIGILÂNCIA SANITÁRIA

ATA DE DEFESA

Ata de Sessão Pública nº 01/2024 de arguição e defesa do Trabalho de Conclusão de Residência do Programa de Residência Uniprofissional de Medicina Veterinária em Vigilância Sanitária

Aos 21 dias do mês de fevereiro de 2024, às 10:00h, realizou-se no Centro de Treinamento do Humaitá, a sessão pública para arguição e defesa do Trabalho de Conclusão de Residência intitulado *Avaliação de metodologia alternativa para análise de E. coli no LASP/IVISA-RIO*, apresentado por **Victor Hugo Ribeiro Jayme**, sob orientação de **Pedro Campinho Belsito**. A Banca Examinadora aprovada pelo Programa de Residência Uniprofissional de Medicina Veterinária em Vigilância Sanitária foi constituída pelos seguintes membros:

M.e. Pedro Campinho Belsito - Presidente da Banca examinadora

M.e. Rafaela de Carvalho Pereira da Silva - Membro interno

Dra. Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte - Membro externo

Após arguição e defesa da residente, a Banca Examinadora passou à arguição pública e realizou o seu julgamento.

PARECER:

A comissão decidiu pela:

- Aprovação
- Aprovação condicionada às modificações
- Reprovação

Para constar do processo respectivo, a Banca Examinadora elaborou a presente ata, que vai assinada por todos os seus membros.

Observações da Banca: (Recomendações de modificações, ajustes, sugestões de publicações, outros comentários; se necessário anexar folhas adicionais com parecer detalhado)

*Seguir as orientações nos exemplares de avaliadores.
Dirimir os resultados com base em referências analisadas.
(não foram utilizadas referências bibliográficas na discussão)*

Ressalto que por motivos operacionais a defesa ocorreu no auditório do 2º andar da central de regulacões do Hospital Municipal Senza Agonia. RCB

Rafaela Carvalho

Assinatura do Membro Interno
(M.e. Rafaela de Carvalho Pereira da Silva)

Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte

Assinatura do Membro externo
(Dra. Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte)

Pedro Campinho Belsito

Assinatura do orientador
(M.e. Pedro Campinho Belsito)

Carla Castro
Coordenadora do Programa de Residência
Uniprofissional em Vigilância Sanitária
S/IVISA-RIO/CGIPE
Matrícula: 11/319479-2

Dra. Carla Oliveira de Castro

Coordenadora do Programa de Residência Uniprofissional de Medicina Veterinária
em Vigilância Sanitária
S/IVISA-RIO/CGIPE
Matrícula: 11/319479-2