

DOI:10.3395/vd.v2i1.60



ARTIGO

Produção de material de referência para ensaio de proficiência de enumeração de *Bacillus cereus* em leitePreparation of reference material for proficiency test for enumeration of *Bacillus cereus* in milk**Marcelo Luiz Lima Brandão**

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

Carla de Oliveira Rosas

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Silvia Maria Lopes Bricio

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Juliana de Castro

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Valéria de Mello Medeiros

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Marcus Henrique**Campino de la Cruz**

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Armi Wanderley da**Nóbrega**

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

A participação em ensaios de proficiência é essencial para que um laboratório de ensaio possa ter seu desempenho avaliado por meio de uma comparação interlaboratorial. O objetivo deste trabalho foi produzir um material de referência (MR) quantitativo para EP contendo *Bacillus cereus* em leite em pó. Uma solução estéril de leite desnatado a 10% contendo 100 mM de sacarose foi contaminada com uma cepa de *B. cereus* em uma concentração previamente determinada. A matriz foi homogeneizada, distribuída em frascos e liofilizada. O lote produzido foi considerado suficientemente homogêneo atribuindo-se um desvio-padrão alvo de 0,25 log₁₀ UFC/mL. O MR apresentou-se estável a ≤ -70 °C e (-20 ± 4) °C durante 1.058 e 60 dias, respectivamente. Na avaliação da influência de diferentes temperaturas para o transporte deste material, o MR se apresentou estável a 4 °C, 25 °C e 35 °C durante o período de quatro dias de estudo. Conclui-se que o lote produzido apresentou todos os requisitos necessários para ser utilizado como itens de EP.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus Cereus*; Leite; Material de Referência; Item de Ensaio; Ensaio de Proficiência

ABSTRACT

The participation in proficiency testing (PT) is essential for testing laboratories to prove their technical competence. The aim of this study was to produce a quantitative reference material (RM) for PT containing *Bacillus cereus* in milk powder. A sterile solution of 10% skim milk containing 100 mM sucrose was contaminated with a *B. cereus* strain in a specific concentration. The homogenized matrix was distributed into vials and freeze-drying. The batch produced was considered sufficiently homogeneous assigning a target standard deviation of 0.25. The RM was stable at ≤ -70 °C and (-20 ± 4) °C for 1,058 and 60 days, respectively. In the evaluation of temperatures for the transport of material, the RM was stable at 4, 25 and 35 °C during four days. It is concluded that the batch produced had all the necessary requirements to be used as items of PT.

KEYWORDS: *Bacillus Cereus*; Milk; Reference Material; Test Item; Proficiency Test



Introdução

Os alimentos são uma das grandes preocupações da saúde pública, pois o controle higiênico e sanitário destes constitui um fator preponderante para a prevenção das doenças de origem alimentar¹. Logo, as atividades desenvolvidas nos laboratórios que realizam o controle da qualidade de alimentos são de grande importância para a avaliação da segurança dos produtos².

É recomendado que os laboratórios oficiais que realizam o controle microbiológico de alimentos utilizem métodos reconhecidos internacionalmente. Além disso, os métodos devem ser submetidos a controles internos e externos de qualidade³. Para atingir esses objetivos, é necessário o uso de elementos de referência - padrões rastreáveis e/ou materiais de referência (MR). A rastreabilidade é um aspecto essencial da garantia da qualidade para se obter aceitação internacional de dados analíticos⁴.

Uma das formas de garantir a confiabilidade dos resultados gerados por um laboratório é a participação em ensaios de proficiência (EP). O EP é uma ferramenta de controle de qualidade externo, em que itens de ensaio caracterizados, suficientemente homogêneos e estáveis, são enviados para diferentes laboratórios. Assim, o EP permite a comparação do desempenho obtido por um laboratório, na análise de um mesmo item de ensaio com um parâmetro específico⁵.

Um dos sistemas de garantia da qualidade utilizados em laboratórios de ensaio é a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, que descreve os "Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração"⁶. A participação em EP e/ou em comparações interlaboratoriais é um dos requisitos descritos por essa norma. A acreditação segundo os requisitos descritos na norma mencionada permite diversas vantagens ao laboratório acreditado, tais como: a conquista de novos mercados; diferenciação competitiva; o aumento da confiança dos clientes nos resultados das calibrações ou ensaios oferecidos; entre outras⁷.

Como forma da avaliação da qualidade técnica de laboratórios de microbiologia de alimentos, provedores de EP disponibilizam programas de ensaios de proficiência que abordem ensaios qualitativos e quantitativos, em geral realizados na rotina dos laboratórios, envolvendo micro-organismos de importância em alimentos^{2,8,9}.

Na área de microbiologia de alimentos, existe uma necessidade de MR homogêneos e estáveis quanto ao número de micro-organismos¹⁰. Os MR disponíveis podem apresentar desvantagens, como: dificuldade de manipulação ou dissolução, problemas de heterogeneidade e elevados custos de transporte em temperatura de congelamento¹¹.

O estudo do uso de MR no Brasil é relativamente recente. As "Diretrizes Estratégicas para a Metrologia Brasileira 2008-2012" aprovaram várias metas relacionadas ao estabelecimento de referências metroológicas, dentre as quais o desenvolvimento de MR. De acordo com a Resolução, a metrologia é uma área estratégica para o desenvolvimento econômico e social do País, por ser parte integrante da infraestrutura básica de apoio à competitividade das nossas empresas e à proteção do consumidor¹². Logo, o incen-

tivo na capacitação das instituições científicas para a produção de MR é, portanto, de extrema importância.

Em razão da carência de MR disponíveis e sua necessidade na garantia da qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados nos laboratórios de microbiologia de alimentos, o objetivo deste trabalho foi produzir um lote de MR a ser utilizado em um EP para determinação de *B. cereus* em matriz leite em pó pela técnica de liofilização. Esse micro-organismo foi selecionado por ser um dos parâmetros para a avaliação das condições sanitárias de amostras de leite em pó segundo a legislação brasileira vigente¹³.

Método

Micro-organismo

A cepa de *B. cereus* n° P3441 foi utilizada para produção dos itens de ensaio. Essa cepa foi isolada a partir de uma amostra de farinha de mandioca e identificada com uso do sistema semiautomatizado Vitek®2 Compact (BioMérieux, França). A estirpe se encontra depositada na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

Preparo dos itens de ensaio

Os itens de ensaio foram preparados seguindo os requisitos da ABNT ISO GUIA 34 "Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência"¹⁴. A preparação do lote teve como base a metodologia desenvolvida por Rosas et al.¹⁵.

A cepa de *B. cereus* foi semeada, pela técnica de esgotamento, em ágar sangue de carneiro (Merck, Alemanha) e incubada por 24 h a (35 ± 2) °C para verificação de sua pureza. Uma colônia isolada foi semeada em 10 mL de caldo infusão cérebro-coração (Merck, Alemanha) e incubada a (35 ± 2) °C por 24 h. Posteriormente, a cultura foi centrifugada e o pellet suspenso em solução salina peptonada (SSP) a 0,1%. A concentração da suspensão foi ajustada em aparelho fotocolorímetro (Libra S2, Biochrom, Inglaterra) a 520 nm até um valor de transmitância de 6% (equivalente a 10⁹ células/mL). A solução foi diluída em leite desnatado a 10% (Skim Milk, Difco, EUA) contendo 100 mM de sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) (Merck, Alemanha). A solução foi homogeneizada durante 20 min e porções de 1 mL foram distribuídas em 142 frascos estéreis de capacidade de 4 mL (Schott, Brasil). Os frascos foram congelados em ultrafreezer (Thermo, EUA) a temperatura ≤ - 70 °C por 24 h. O material foi submetido a um ciclo de liofilização (K 105, Liotop, Brasil) de 24 h. Após a retirada dos frascos do liofilizador, foi realizada uma inspeção visual com o objetivo de avaliar o aspecto das amostras liofilizadas (presença de liquefação, caramelização ou sinais de colapso estrutural das amostras). Posteriormente, foi realizada a verificação do vácuo em todos os frascos, utilizando um aparelho emissor de centelha elétrica (Bobina de Tesla Coil 2-12-8, Brasil). Os frascos foram lacrados com tampa metálica, identificados e estocados a temperatura ≤ - 70 °C.



Ensaios microbiológicos

A quantificação do número de células presente nos frascos utilizados na avaliação da homogeneidade e estudos de estabilidade foi realizada pela técnica de plaqueamento direto descrito no *Bacteriological Analytical Manual Online - FDA*¹⁶.

O material liofilizado foi reconstituído com 1 mL de SSP a 0,1% e mantido em temperatura ambiente durante 15 min. Duas alíquotas de 0,1 mL foram semeadas por espalhamento na superfície de duas placas de ágar manitol gema de ovo com polimixina (BioRad, EUA) e incubadas por 18-24 h a (30 ± 2) °C. Após a incubação, foi realizada a contagem total das colônias e os valores foram convertidos em \log_{10} .

Avaliação da homogeneidade

Dez frascos foram selecionados aleatoriamente e quantificados sob condições de repetibilidade. Os resultados foram submetidos à análise estatística descrita no Protocolo Internacional Harmonizado⁵ atribuindo-se um desvio-padrão (σ_p) de $0,25 \log_{10}$ UFC/mL, conforme adotado em rodadas de EP realizadas pelo INCQS⁹.

Estudo de estabilidade

Foram realizados três tipos de estudo, um na temperatura de referência (≤ -70 °C), um na temperatura de armazenamento (-20 °C \pm 4 °C) e outro em condições que simulam o transporte dos itens de ensaio (4 °C, 25 °C e 35 °C).

O estudo de estabilidade nas temperaturas de referência e armazenamento foi realizado seguindo o modelo clássico¹⁷. No estudo na temperatura de referência, 66 frascos foram quantificados, seis por ensaio, em intervalos de tempo determinados até um total de 1.058 dias. No estudo na temperatura de armazenamento, 12 frascos estocados a ≤ -70 °C foram transferidos para um freezer à temperatura de (-20 ± 4) °C. Nesse mesmo momento, dois frascos que estavam estocados à temperatura ≤ -70 °C foram quantificados, representando o dia “zero”. Uma vez por semana, por um período de seis semanas, dois frascos que estavam estocados a (-20 ± 4) °C foram quantificados.

O estudo de estabilidade nas temperaturas de transporte foi realizado de acordo com o modelo isócrono¹⁸. A cada dia dois frascos, selecionados aleatoriamente, foram acondicionados em embalagens próprias para transporte de material biológico (Concepta, Brasil) e incubados em cada uma das referidas temperaturas. No quinto dia, foi realizada a quantificação de todos os frascos incubados e de dois frascos estocados a ≤ -70 °C, representando o dia “zero”.

Os valores das contagens obtidos em cada temperatura estudada foram avaliados pela análise de resíduos da regressão linear em conjunto com a análise da variância, segundo os critérios do ABNT ISO Guia 35¹⁷. Os itens de ensaio foram considerados suficientemente estáveis nas condições estabelecidas nos estudos quando o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular abrange o valor zero.

Resultados e Discussão

Preparo do lote de itens de ensaio

A metodologia desenvolvida por Rosas et al.¹⁵ foi adaptada neste estudo para produção do lote contendo *B. cereus* em leite em pó. A liofilização foi selecionada por ser o processo mais indicado para preservação do número de células de forma precisa, pois a desidratação e a estocagem do material sob atmosfera de vácuo diminuem o metabolismo celular e reações enzimáticas no material¹⁹. Neste estudo, a liofilização se mostrou adequada para preservação do material, uma vez que todos os frascos do lote apresentaram vácuo e aparência satisfatória após a dessecação. Essa técnica já foi utilizada com sucesso na produção de lotes de itens de ensaio contendo outros micro-organismos em matriz leite²⁰, carne bovina²¹ e queijo^{22,23}.

Avaliação da homogeneidade

Os resultados das quantificações dos frascos utilizados para avaliação da homogeneidade estão descritos na Tabela 1. O teste de Cochran não identificou nenhum valor de contagem como

Tabela 1. Resultados da quantificação dos frascos utilizados na avaliação da homogeneidade.

Frasco	Contagem (\log_{10} UFC/mL)			
	Replicata 1	Replicata 2	Média	Desvio-padrão
1	2,88	2,91	2,90	0,02
2	2,89	2,98	2,94	0,06
3	3,02	3,09	3,05	0,05
4	2,94	3,01	2,98	0,04
5	2,96	3,09	3,02	0,09
6	2,97	3,02	2,30	0,04
7	2,86	2,99	2,92	0,10
8	2,96	2,99	2,98	0,02
9	3,04	3,09	3,06	0,03
10	2,89	2,89	2,89	0



outlier e o valor de s^2_s calculado foi de 0,0023 e “c” de 0,0134. Como o critério $s^2_s < c$ foi atendido, o lote foi considerado suficientemente homogêneo com um nível de confiança de 95%.

A avaliação da homogeneidade é um dos pré-requisitos para a produção de itens de ensaio, pois garante que laboratórios participantes de um EP recebam itens de ensaio que não apresentem diferenças significativas nos parâmetros a serem mensurados^{5,17}. De acordo com a avaliação estatística utilizada, o lote produzido neste estudo atendeu a esse requisito. Outros autores já relataram a produção de MR para EP homogêneos em matrizes de alimentos utilizando o processo de liofilização e os critérios do Protocolo Internacional Harmonizado como forma de avaliação. A obtenção de MR suficientemente homogêneos contendo *S. aureus* e *E. coli* em matriz queijo^{22,23} e *Salmonella* spp. em carne bovina²¹ já foi descrita. Na matriz leite, itens de ensaio homogêneos contendo *Salmonella* spp.¹⁵, *Citrobacter freundii*⁹, *E. coli*²⁴, *S. aureus* e *Listeria innocua*²⁰ já foram produzidos e estudados. Quanto à MR contendo *B. cereus*, In’t Veld *et al.*²⁵ produziram um lote que incluía células esporuladas de *B. cereus* em leite em pó pela técnica de *spray dryer*. Contudo, a avaliação estatística utilizada para avaliação da homogeneidade foi de acordo com a Distribuição de Poisson, que era o teste mais comumente utilizado na época, o que dificultou a comparação com os resultados deste estudo. Em uma pesquisa mais recente, Abdelmassih *et al.*¹⁰ produziram um lote contendo esporos de *B. cereus* adsorvidos em precipitado de carbonato de cálcio que se apresentou suficientemente homogêneo segundo o Protocolo Internacional Harmonizado. Logo, pode-se verificar que é possível a obtenção de um MR para EP suficientemente homogêneo utilizando-se as células de *B. cereus* tanto na forma vegetativa quanto na forma de esporos.

Estabilidade dos itens de ensaio

Os resultados das análises realizadas no estudo de estabilidade nas temperaturas de referência, armazenamento e transporte são apresentados nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

O lote foi considerado estável de acordo com o ABNT ISO Guia 35 em todas as temperaturas estudadas (Tabela 2).

A estabilidade também é uma característica do item de ensaio, pois garante a manutenção das propriedades do analito ao longo do seu tempo de validade¹⁷. O estudo de estabilidade verifica as possíveis variações que os itens de ensaio de um lote possam sofrer, alterando a sua característica de homogeneidade⁵. O material apresentou-se estável na temperatura de referência durante todo o período estudado ($\cong 3,23$ anos). Outros autores também obtiveram resultados satisfatórios na produção de MR para EP previamente liofilizados em matriz leite, demonstrando-se estáveis nessa mesma condição. Brandao *et al.*²⁰ produziram itens de ensaio contendo ECP e *L. innocua* estável a -70 °C por 212 e 239 dias, respectivamente. Já Rosas *et al.*²⁴ produziram lotes de MR contendo *E. coli* estáveis durante 4 meses.

O valor em módulo do coeficiente angular obtido representa a variação da concentração celular ao longo do tempo, sendo esta crescente caso o valor do coeficiente angular seja positivo e decrescente caso o valor seja negativo. Neste estudo, o valor do coeficiente angular obtido no estudo de estabilidade na temperatura de armazenamento foi $-0,00002 \log_{10}$ UFC/frasco (Tabela 2), que é considerado muito baixo, pois o decréscimo celular calculado seria de aproximadamente 1,02 UFC por ano. Mesmo assim, monitoramentos subsequentes serão realizados para determinar se esse material se manterá estável nessa condição.

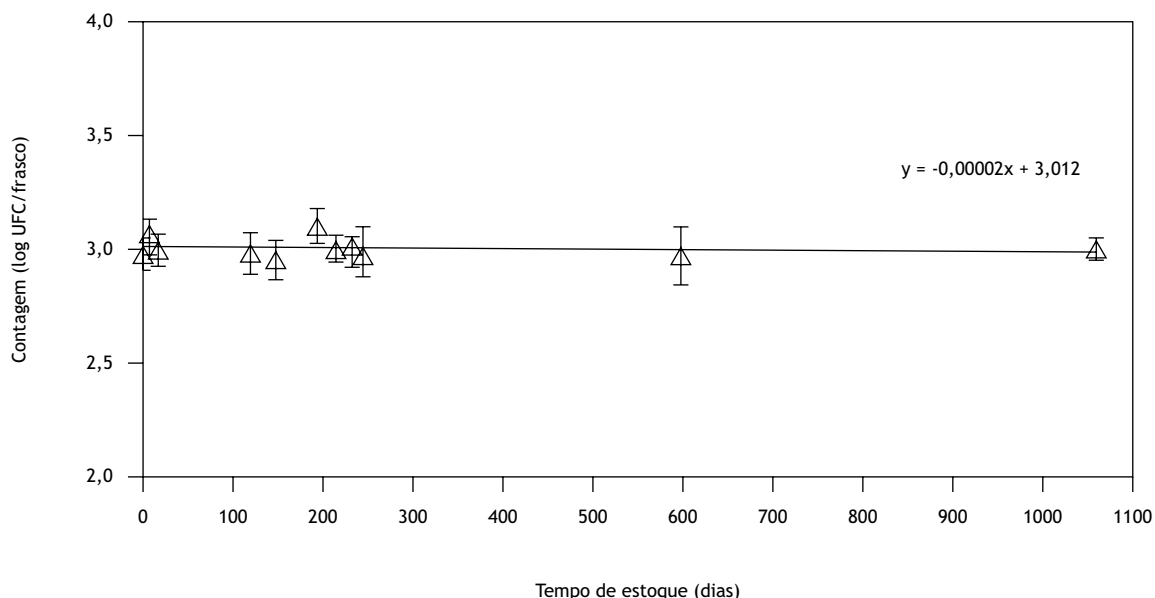


Figura 1. Resultados do estudo de estabilidade na temperatura de referência (≤ -70 °C) por um período de 1.058 dias. Cada ponto (Δ) corresponde à média \pm desvio-padrão da contagem de seis frascos do item de ensaio (em \log_{10} UFC/frasco). x = tempo de estoque (dias); y = contagem (\log_{10} UFC/frasco).

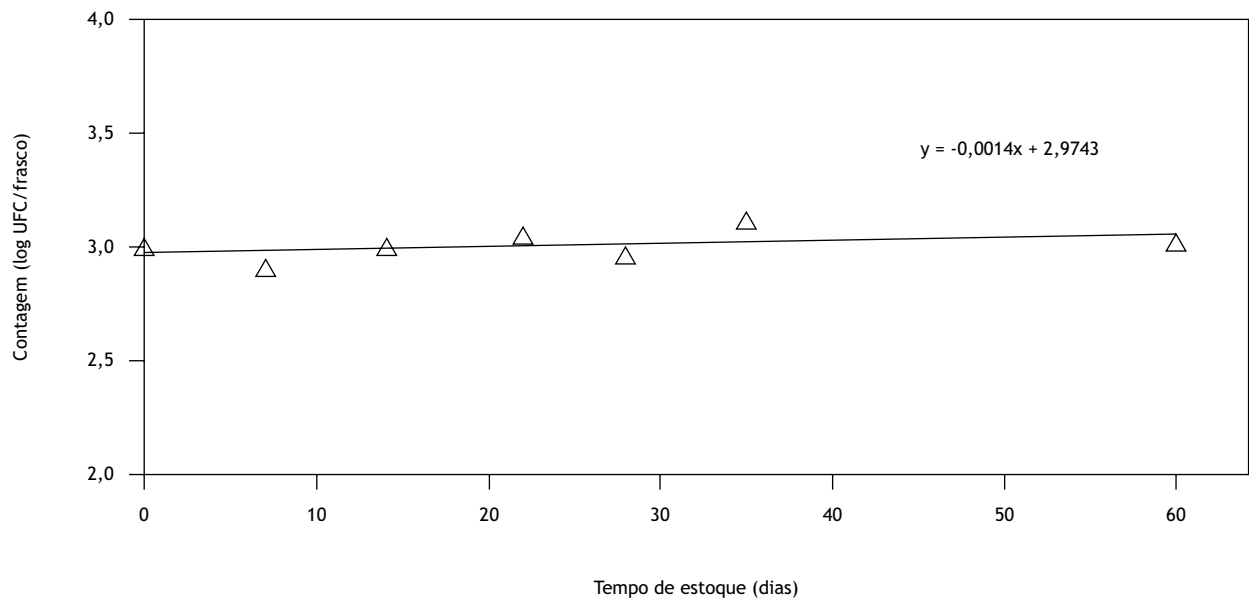


Figura 2. Resultados do estudo de estabilidade na temperatura de armazenamento (-20 ± 4) °C por um período de 60 dias. Cada ponto (Δ) corresponde à média da contagem de dois frascos do item de ensaio (em \log_{10} UFC/frasco). x = tempo de estoque (dias); y = contagem (\log_{10} UFC/frasco).

O lote produzido apresentou-se estável a (-20 ± 4) °C durante 60 dias e de acordo com a análise estatística da regressão linear não apresenta perspectiva de grande variação ao longo do tempo nessa temperatura. Esse resultado foi similar ao relatado por Brandao *et al.*²², que produziram um lote contendo *S. aureus* em queijo estável a -20 °C durante 48 dias e um lote contendo *E. coli* estável por 161 dias²³. Contudo,

Rosas *et al.*¹⁵ observaram que o estoque por longos períodos à temperatura de -20 °C pode comprometer a estabilidade de MR liofilizados em leite. Esses autores produziram dois lotes contendo *Salmonella* spp. estáveis durante três meses de estoque, mas com tendência de decréscimo da concentração celular, e após um ano os MR não se apresentavam mais estáveis. Esse resultado indica que o material contendo *B. cereus* produzido

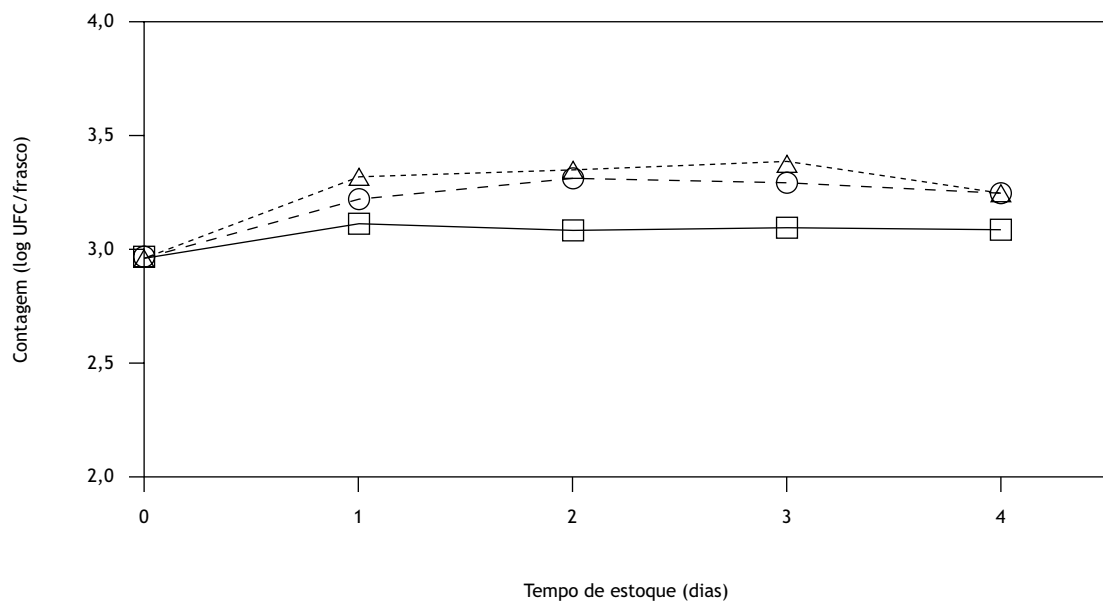


Figura 3. Resultados do estudo de estabilidade de transporte nas temperaturas de: (Δ), 4 °C; (\circ), 25 °C; (\square), 35 °C durante um período de quatro dias. Cada ponto corresponde à média da contagem de dois frascos do item de ensaio (em \log_{10} UFC/frasco). x = tempo de estoque (dias); y = contagem (\log_{10} UFC/frasco).



Tabela 2. Sumário da regressão linear do estudo de estabilidade.

Temperatura de estoque (°C)	Tempo de estoque (dias)	Coeficiente angular ¹	Intervalo de confiança ¹		Resultado
			Inferior	Superior	
≤ - 70	1.058	-0,00002	-0,00013	0,00008	Estável
- 20 ± 4	60	0,00142	-0,00196	0,00480	Estável
4	4	0,06397	-0,09295	0,22090	Estável
25	4	0,06607	-0,03675	0,16888	Estável
35	4	0,02353	-0,03058	0,07764	Estável

¹ Valores expressos em \log_{10} UFC/frasco.dias¹.

neste estudo possui uma estabilidade mais duradoura do que os produzidos por Rosas *et al.*¹⁵. Essa observação pode estar associada ao fato de as bactérias Gram-negativas, no caso de Rosas *et al.*¹⁵ a cepa de *Salmonella* Enteritidis, apresentarem, em geral, maior taxa de declínio que as bactérias Gram-positivas^{8,26}, que neste trabalho foi a cepa de *B. cereus*. Mesmo não tendo sido realizado nenhum procedimento de esporulação na cultura de *B. cereus*, o fato de essa espécie ser capaz de se apresentar na forma de esporos também pode ter contribuído para maior estabilidade do material. Além disso, o uso da sacarose como crioprotetor pode ter proporcionado maior estabilidade dos micro-organismos na matriz, uma vez que no estudo de Rosas *et al.*¹⁵ não foi adicionado nenhum aditivo crioprotetor ao leite. A sacarose foi utilizada por ser o glicídio mais frequentemente utilizado na criopreservação de bactérias²⁷ e por ter apresentado o melhor resultado na avaliação de diferentes crioprotetores para produção de um MR para EP contendo *E. coli* em matriz leite em pó²⁴.

O material apresentou-se estável em todas as temperaturas de transporte estudadas durante o período de até quatro dias. Esses resultados foram melhores que os relatados por outros autores, que não obtiveram estabilidade nos materiais que produziram contendo bactérias Gram-negativas quando estocados a temperaturas superiores a 25 °C^{15, 21, 23}. Por outro lado, esse resultado foi similar ao do MR contendo *S. aureus* na matriz queijo²², que também se apresentou estável a 35 °C durante quatro dias. Novamente, esse resultado pode estar associado às características intrínsecas das bactérias Gram-positivas, que conferem maior resistência à exposição a temperaturas mais elevadas.

A obtenção de MR para EP estável a diferentes condições adversas, como variações de temperatura, é importante no sentido de baratear o custo de envio, pois o transporte sob condições de temperatura controlada encarece seu custo final²³. Os resultados obtidos indicam que os itens de ensaio produzidos poderiam ser transportados aos laboratórios participantes do EP a uma temperatura ≤ 35 °C em até quatro dias, uma vez que os resultados estatísticos indicaram a manutenção da concentração de células do item de ensaio de proficiência durante esse período. No envio desses itens de ensaio para laboratórios é importante o monitoramento da temperatura ao longo do transporte, como, por exemplo, o uso de registrado-

res de temperatura, de forma a garantir que a faixa de temperatura e o prazo de envio não sejam excedidos.

Conclusões

A metodologia empregada neste trabalho foi considerada satisfatória para a produção de um lote de itens de ensaio de proficiência quantitativo homogêneo e estável destinado ao ensaio de enumeração de *B. cereus* em leite em pó. Logo, esse material é viável para utilização em um EP. A metodologia utilizada neste estudo poderá servir de subsídio para o desenvolvimento de outros itens de ensaio de proficiência ou candidatos a MR contendo outros micro-organismos em alimentos de interesse para a Vigilância Sanitária.

Agradecimentos

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

Referências

1. Germano PMLG, Germano MIS. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 4ª ed. São Paulo: Manole; 2011.
2. Augustin J, Carlier V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by inter-laboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiol* 2006;23(1):1-38.
3. Koch M, Bremser W, Köppen R, Krüger R, Rasenko T, Siegel D, et al. Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. *Accred Qual Assur* 2011;16(8-9):429-37.
4. Moura SS, Costa SRR. Estudo da utilização de materiais de referência nas análises de água por laboratórios envolvidos no sistema de acreditação. *Prod* 2009;19(2):304-16.
5. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem* 2006;78(1):145-96.
6. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro; 2005.



7. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. *DOQ-CGRE-001: orientação para acreditação de laboratórios, produtores de materiais de referência e provedores de ensaio de proficiência*. Brasília; 2012.
8. Peterz M, Steneryd AC. Freeze-dried mixed cultures as reference samples in quantitative and qualitative microbiological examinations of food. *J Appl Bacteriol* 1993;74(2):143-8.
9. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. *Relatório final do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos - 1ª Rodada - Pesquisa de Salmonella spp. em alimentos. Relatório Final - Nº 003/2011* [internet]. Rio de Janeiro; 2011 [acessado 2013 Jul 24]. Disponível em: http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=94&Itemid=72
10. Abdelmassih M, Planchon V, Anceau C, Mahillon, J. Development and validation of stable reference materials for food microbiology using *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores. *J Appl Microbiol* 2011;110(6):1524-30.
11. Philipp WJ, Iwaarden PV, Schimmel H, Meeus N, Kollmorgen N. Development of reference materials for microbiological analysis. *Accred Qual Assur* 2007;12(3-4):134-8.
12. Conselho Nacional de Metrologia. *Normalização e Qualidade Industrial. Diretrizes Estratégicas para a Metrologia Brasileira 2008 - 2012* [internet]. Rio de Janeiro; 2008 [acessado 2013 Jul 24]. Disponível em: http://www.metrologia.org.br/docs/portugues/diretrizesestrategicas_2008_20012.htm
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial da União* 2001;10 jan;Seção1:45.
14. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT ISO GUIA 34: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência*. Rio de Janeiro; 2012.
15. Rosas CO, Brandao MLL, Bricio SML, Medeiros VM, Bernardo SPC, De la Cruz MHC, et al. Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2010;69(1):15-22.
16. Tallent SM, Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW. *Bacillus cereus*. In: United States, Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual* [internet]. 8ª ed. Spring; 2012 [acessado 2013 Jul 24]. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>
17. Associação Brasileira de Normas Técnicas. *NBR ISO GUIA 35 - materiais de referência - princípios gerais e estatísticos para certificação*. Rio de Janeiro; 2012.
18. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J Anal Chem* 1998;360(3-4):359-61.
19. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* 2006;66(2):183-93.
20. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Costa JCB, Medeiros VM, Warnken MB. Produção de materiais de referência para avaliação de métodos microbiológicos em alimentos: estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. em leite em pó. *Rev Analytica* 2013;63:60-71.
21. Vieira LR, Rosas CO, Brandao MLL, Medeiros VM, Costa JCB, Bricio SML. Desenvolvimento de metodologia para a produção de material de referência em matriz de carne bovina para detecção de *Salmonella* spp. In: *Anais do XVII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos e III Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos*; 2011; Cuiabá, BR. Cuiabá; 2011.
22. Brandao MLL, Costa JCB, Farias FM, Rosas CO, Bricio SML, Nascimento JS, et al. Desenvolvimento de material de referência para microbiologia de alimentos contendo estafilococos coagulase positiva em matriz queijo. *Braz J Food Technol* 2013;16(1):73-9.
23. Brandao MLL, Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, Costa JCB, Pinheiro RR, et al. Preparation of reference material for proficiency test for enumeration of coliforms in cheese matrix. *Detection* 2013;1(1):7-12.
24. Rosas CO, Bricio SML, Medeiros VM, Brandao MLL, Costa JCB. Estudo de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes a 45°C em matriz leite em pó. In: *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia*; 2011; Foz do Iguaçu, BR. Foz do Iguaçu; 2011.
25. In't Veld PH, Havelaar AH, Van Strijp-Lockfeer NGWM. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 1999;86(2):266-74.
26. Wessman P, Mahlin D, Akhtar S, Rubino S, Leifer K, Kessler V, et al. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. *J Scic Food Agric* 2011;91(14):2518-28.
27. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 2003;46(3):205-29.

Data de recebimento: 24/07/2013

Data de aceite: 04/12/2013