

Normas **Técnicas**

BLH-IFF/NT 40.21

**Controle de Qualidade
Microbiológico - Teste
Simplificado para Detecção
de Coliformes Totais**



Origem

Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde

Autores

João Aprígio Guerra de Almeida
Franz Reis Novak
Vander Guimarães

Revisores

Andreia Fernandes Spinola
Danielle Aparecida da Silva
Jonas Borges da Silva
Maíra Domingues Bernardes Silva
Mariana Simões Barros
Miriam Oliveira dos Santos
Mônica Barros de Pontes

Designer Gráfico

Chester Robison Pereira Martins

1ª publicação: BLH-IFF/NT 40.05: Controle de Qualidade Microbiológico - Teste Simplificado para Detecção de Coliformes Totais.

1ª revisão: BLH-IFF/NT 40.11

2ª revisão: BLH-IFF/NT 40.21

Palavras-chaves

Banco de Leite Humano. Leite Humano Ordenhado Pasteurizado. Qualidade. Microbiologia. Coliformes

Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano
Programa de Certificação Fiocruz para Bancos de Leite Humano
Sede: IFF/Fiocruz/ Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano.
Avenida Rui Barbosa 716, 1º andar, Flamengo, Rio de Janeiro - RJ, cep: 22250-020
Contatos:
(21) 2554-1703 - Banco de Leite Humano
(21) 2554-1889 - Secretaria Executiva rBLH
email: rblh@fiocruz.br / Portal: www.rblh.fiocruz.br



SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Documentos Complementares
3. Definição
4. Fundamentos
5. Condições Gerais
6. Condições Específicas
7. Referências Bibliográficas
8. Anexos

1. Objetivo

Esta Norma Técnica tem por objetivo estabelecer as orientações necessárias para a determinação da presença de bactérias coliformes totais no leite humano ordenhado pasteurizado, visando a garantia da qualidade em Bancos de Leite Humano e sua certificação.

2. Documentos Complementares

Na elaboração desta Norma Técnica foram consultados:

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários. Rio de Janeiro, 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 34.21: Pasteurização do Leite Humano Ordenhado. Rio de Janeiro, 2021.

REDE BRASILEIRA DE BANCOS DE LEITE HUMANO. BLH-IFF/NT 51.21: Biossegurança em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta de Leite Humano. Rio de Janeiro, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 04 set. 2006.

3. Definições

3.1. **Ambiência:** espaço arquitetonicamente organizado, meio físico especialmente preparado para o exercício de determinada atividade.

3.2. **Coliformes Termotolerantes:** subgrupo de bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24/48 horas; tem como principal representante a *Escherichia coli*, de origem fecal.


3.3. **Coliformes Totais (bactérias do grupo coliforme):** bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, capazes de desenvolver-se na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24/48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase.

4. Fundamentos

O controle de qualidade microbiológico do leite humano ordenhado praticado pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano segue a lógica preconizada para alimentos, que institui a utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária.

Neste contexto, o grupo coliforme tem ocupado lugar de destaque, por ser de cultivo simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-negativos.

A partir do procedimento clássico para detecção de coliformes totais, foi desenvolvida uma metodologia alternativa que consiste no inóculo de quatro alíquotas de 1mL cada, pipetadas de forma independente, em tubos com 10mL de Caldo Verde Bile Brilhante (BGBL) a 5% p/v, com tubos de Durham em seu interior.



Após a inoculação e incubação a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a presença de gás no interior do tubo de Durham caracteriza resultado positivo. O tubo positivo, por sua vez, deve ser repicado, com auxílio de alça bacteriológica, calibrada de 5mm, isto é, com capacidade de 10 microlitros (μL) para tubos contendo BGBL na concentração de 40g/L.

Após a incubação destes tubos por igual período, a presença de gás confirma a existência de microrganismos do grupo coliforme, tornando o produto impróprio para consumo. A metodologia alternativa e a clássica não diferem entre si, quando comparadas pelo teste de Qui-Quadrado, ao nível de 5% de probabilidade.

5. Condições Gerais

5.1. O Controle de Qualidade Microbiológico deverá ser realizado imediatamente após a processamento do leite humano ordenhado.

5.2. Os frascos deverão permanecer em cadeia de frio durante a coleta de amostras para o controle de qualidade microbiológico.

5.3. Prévio a realização das análises, o profissional deve verificar a validade e integridade do meio de cultura a serem utilizados, assim como as condições das vidrarias.

6. Condições Específicas

6.1. Para iniciar o processo de preparo do meio de cultura o profissional deve paramentar-se de acordo com as Normas Técnicas BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários e BLH-IFF/NT 51.21: Biossegurança em Bancos de Leite Humano e Postos de Coleta.

6.2. Os seguintes materiais são necessários para a realização da análise microbiológica:

- a. Pipetas sorológicas graduadas de 1mL de capacidade e esterilizadas ou Pipetador automático com ponteiros descartáveis de 1mL;
- b. Tubos de Durham;
- c. Tubos indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15mL;
- d. Autoclave que permita operar por 121°C por 15 minutos;
- e. Estufa bacteriológica para cultura, regulada a 36°C , com exatidão de $\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- f. Balança semi-analítica com sensibilidade de 0,1g calibrada;
- g. Alça bacteriológica calibrada a 10 microlitros;
- h. Bico de Bunsen ou Capela de Fluxo Laminar;
- i. Béquer para preparo de meio de cultura;
- j. Tubo de vidro com tampa rosqueável com capacidade mínima de 15 mL;
- k. Frasco de Erlenmeyer;
- l. Estante para suporte, revestida em PVC;
- m. Gelo reciclável;
- n. Caixas isotérmicas revestidas em PVC.

6.3. Materiais e reagentes:

- a. Caldo Verde Bile Brilhante 2% Lactose;
- b. Água destilada ou deionizada.

6.4. Procedimento:

6.4.1. Preparo dos meios de cultura e reagentes:

6.4.1.1. Preparo de Caldo Verde Bile Brilhante - Concentrado (5% p/v):

- a. Pesar 50g do meio de cultura Caldo Verde Bile Brilhante em vidraria apropriada utilizando balança semi-analítica com sensibilidade de 0,1g calibrada;
- b. Medir 1 litro de água destilada ou deionizada em proveta;
- c. Adicionar 200 ml de água destilada ou deionizada, para a dissolução do meio de cultura. Misturar com auxílio de bastão de vidro ou com agitador magnético em placa aquecida;
- d. Após a dissolução completa do meio de cultura, vá adicionando pouco a pouco o volume restante de água destilada ou deionizada restante da proveta, continuando a agitação até completar o volume de 1 litro e sua completa dissolução;
- e. Distribuir 10mL do meio de cultura já preparado em tubos de vidro com tampas rosqueáveis, indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15mL, já contendo os tubos de Durham invertidos no seu interior;
- f. Identificar o lote de meio produzido com o nome do meio, concentração e data do preparo;
- g. Fechar os tubos deixando suas tampas a $\frac{1}{4}$ de volta para a sua esterilização;
- h. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos ou em temperatura preconizada pelo fabricante, em autoclave;
- i. Ao fim do processo de esterilização, esperar o esfriamento do equipamento para abrir a válvula de escape de ar e prosseguir com a retirada dos tubos com meio de cultura. Esse procedimento impede a formação de microbolhas no interior dos tubos de Durham;
- j. Após a retirada dos tubos do interior da autoclave, fechar os tubos, verificar se houve a formação de microbolhas e identificar os lotes de tubos com nome do meio, concentração e prazo de validade;
- k. Proceder com a validação do teste de esterilidade, incubando no mínimo 10% do lote de meio de cultura em estufa a 36°C +1°C por 24h. A formação de gás ou turvação do meio em um único tubo desqualifica todo lote produzido;
- l. Após o teste de esterilidade, os tubos com meio de cultura poderão ser armazenados sob refrigeração a 5°C, por no máximo 15 dias.

6.4.1.2. Preparo de Caldo Verde Bile Brilhante - Simples (4% p/v):

- a. Pesar 40g do meio de cultura Caldo Verde Bile em vidraria apropriada utilizando balança semi-analítica com sensibilidade de 0,1g calibrada;
- b. Medir 1 litro de água destilada ou deionizada em proveta;
- c. Adicionar 200 ml de água destilada ou deionizada, para a dissolução do meio de cultura. Misturar com auxílio de bastão de vidro ou com agitador magnético em placa aquecida;
- d. Após a dissolução completa do meio de cultura, vá adicionando pouco a pouco o volume restante de água destilada ou deionizada restante da proveta, continuando a agitação até completar o volume de 1 litro e sua completa dissolução;
- e. A seguir, distribuir 9ml do meio de cultura em tubos de vidro com tampas rosqueáveis, indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15ml, e adicionar os tubos de Durham invertidos;
- f. Identificar o lote de meio produzido com o nome do meio, concentração e data do preparo;
- g. Fechar os tubos deixando suas tampas a $\frac{1}{4}$ de volta para a sua esterilização;
- h. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos ou em temperatura preconizada pelo fabricante, em autoclave;
- i. Ao fim do processo de esterilização, esperar o esfriamento do equipamento para abrir a válvula de escape de ar e prosseguir com a retirada dos tubos com meio de cultura. Esse procedimento impede a formação de microbolhas no interior dos tubos de Durham;
- j. Após a retirada dos tubos do interior da autoclave, fechar os tubos, verificar se houve a formação de microbolhas e identificar os lotes de tubos com nome do meio, concentração e prazo de validade;
- k. Proceder com a validação do teste de esterilidade, incubando o lote de meio de cultura em estufa a 36°C \pm 1°C por 24h. A formação de gás ou turvação do meio em um único tubo desqualifica todo lote produzido;
- l. Após o teste de esterilidade, os tubos com meio de cultura poderão ser armazenados sob refrigeração a 5°C, por até 15 dias.


6.4.2. Coleta de amostras de leite humano ordenhado pasteurizado para análise e sua inoculação;

6.4.3. Antes de proceder as análises retirar os tubos com o meio de cultura do refrigerador para que os mesmos possam entrar em equilíbrio com a temperatura ambiente;

6.4.4. Certifique-se antes da utilização que os tubos de Durhan estão completamente imersos no meio de cultura e livres de bolhas de ar e depósitos de cristais em seu interior;

6.4.5. Identifique os tubos de acordo com os frascos a serem analisados com auxílio de etiquetas ou caneta específica para vidros;

6.4.6. Após o tratamento térmico (pasteurização), todos os frascos deverão ser mantidos em cadeia de frio, até a etapa de controle de qualidade microbiológico;



6.4.7. Coletar quatro alíquotas de 1 mL da amostra a ser analisada. As amostras deverão ser coletadas, sob campo de chama ou em cabine de segurança biológica, seguindo o rigor microbiológico;

6.4.8. As alíquotas deverão ser coletadas em pontos diferentes do frasco;

6.4.9. Dispor todas as alíquotas de uma mesma amostra em um único tubo de cultura contendo caldo bile verde brilhante concentrado (BGBL 5%);

6.4.10. Tampar os tubos contendo o leite com o meio de cultura e incubá-los a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas, em estufa;

6.4.11. As alíquotas de leite humano pasteurizado coletadas não devem ser congeladas para posterior análises.

6.5. Cuidados com a amostra:

6.5.1. Cada tubo que receber a amostra deve conter o número do frasco do qual o leite foi extraído. O acondicionamento e o transporte das amostras até o laboratório, com o produto para análise deverão ser em caixas isotérmicas mantendo-se as mesmas condições de Cadeia de Frio preconizadas para o LHO.

6.6. Determinação de coliformes totais:

6.6.1. A determinação da presença ou ausência dos coliformes totais se dá pela observância da formação de gás no interior dos tubos de Durham;

6.6.2. São considerados positivos para coliformes aqueles tubos que contenham em seu interior tubos de Durham com formação de bolha (gás), no período de 24 a 48 horas de incubação a temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.6.3. A presença de gás indica um resultado presuntivo, que deverá ser submetido a prova confirmatória, obrigatoriamente.

6.7 Prova confirmatória:

6.7.1. A prova confirmatória para presença de coliformes deve ser realizada selecionando apenas os tubos inoculados com as amostras de leite humano pasteurizado e que apresentaram resultados considerados positivos durante o teste presuntivo;

6.7.2. Antes de iniciar a coleta da amostra, o profissional paramentado de acordo com a Norma Técnica BLH-IFF/NT 11.21: Higiene e Conduta: Funcionários, deve flambar a alça de platina na chama do bico de Bunsen ou em esterilizador automático, não sendo necessário quando se utiliza alças descartáveis;

6.7.3. Coletar uma alíquota de 10 microlitros, com auxílio de alça de platina ou descartável, sob campo de chama ou cabine de segurança biológica, dos tubos selecionados no item 6.4.9.;

6.7.3.1. A amostragem consiste na formação de uma membrana a partir do meio de cultura.

6.7.4. Inocular a alça no meio de cultura na concentração de 4% p/v (Caldo Verde Bile Brilhante Simples);

6.7.5. Tampar os tubos contendo as amostras com o meio de cultura e incubá-los a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas, em estufa;

6.7.6. A temperatura da estufa deve ser monitorada e registrada, no início e fim de um turno de trabalho, com instrumentos próprios para essa finalidade (vide Anexo) e seguindo a Norma Técnica BLH-IFF/NT: 44.21: Controle de Termômetros.



6.8. Resultados:

6.8.1. Considera-se para resultado positivo final, aqueles frascos onde houve a formação de gás no teste confirmatório;

6.8.2. Uma vez que o objetivo da pasteurização é eliminar 100% das bactérias patogênicas, a presença de coliforme em amostra de leite pasteurizado caracteriza o produto como impróprio para consumo;

6.8.3. Os resultados serão expressos como ausência e presença de coliformes totais e registrados em instrumentos próprios para essa finalidade (vide Anexo).

7. Referências Bibliográficas

O referencial teórico que confere sustentação técnico-científica aos fundamentos que compõem esta Norma foi extraído das seguintes fontes:

ALMEIDA, J. A. G., 1986. Qualidade do Leite Humano Coletado e Processado em Bancos de Leite. Dissertação de Mestrado, Viçosa: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

NOVAK, F. R. & ALMEIDA, J. A. G., 2002. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano. *Jornal de Pediatria*, 78:587-591.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz