Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano

PNQBLH – Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano

Sede:
FIOCRUZ/IFF-BLH
Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo
Rio de Janeiro CEP: RJ 20.550-020

Tel/fax: (021) 2553-6331
https://rblh.fiocruz.br

SET 2011 | **BLH-IFF/NT- 40.11**

Teste Simplificado para Detecção de Coliformes Totais

Origem
Centro de Referência Nacional para Bancos de Leite Humano – Instituto Fernandes Figueira / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde

Autores
João Aprígio Guerra de Almeida; Franz Reis Novak e Vander Guimarães.

Palavras-Chave: Banco de Leite Humano. Qualidade. Recursos humanos

8 páginas

SUMÁRIO

1. Objetivo

2. Documentos Complementares

3. Aparelhagem

4. Fundamentos

5. Execução do Ensaio

6. Resultados

ANEXO I – Formulário para Registro Diário de Não-conformidades

ANEXO II – Formulário para Registro Mensal de Não-conformidades

1. Objetivo

Esta Norma Técnica – NT prescreve o método para determinação de bactérias coliformes totais no leite humano ordenhado pasteurizado, com o objetivo de garantir a qualidade, sob o ponto de vista microbiológico, do alimento distribuído pelos Bancos de Leite Humano.

2. Documentos Complementares

Na elaboração desta Norma foram consultados:

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

RDC 171. Normas para Implantação e Funcionamento de Bancos de Leite Humano. DOU – 04/09/206.

Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Anvisa, 2008.

3. Fundamentos

3.1. Quadro Teórico

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.

ALMEIDA, J. A. G., 1992. Fatores de Defesa do Leite Humano: Ecologia microbiana (filme vídeo). 1 cassete VHS, 34 minutos. Rio de Janeiro: Núcleo de Vídeo – CICT/Fundação Oswaldo Cruz.

ALMEIDA, J. A. G., 1992. O Leite Humano: aspectos relativos à composição (filme-vídeo). 1 cassete VHS, 34 minutos. Rio de Janeiro: Núcleo de Vídeo – CICT/Fundação Oswaldo Cruz.

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

3.2 Princípio

O controle de qualidade microbiológico do leite humano ordenhado praticado pela Rede Nacional de Bancos de Leite Humano no Brasil segue a lógica preconizada para alimentos, que institui a utilização de micro-organismos 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 inoculo de quatro alíquotas de 1mL cada, pipetadas de forma independente, em tubos com 10mL de Caldo Verde Brilhante (BGBL) a 5% p/v, com tubos de Durham em seu interior.

Após a inoculação e incubação a 36 ± 1°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 5 mm, isto é, com capacidade de 10 microlitros (mcl) 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.

4. Aparelhagem

A aparelhagem necessária à execução do ensaio deverá constar de:

a. Pipetas sorológicas graduadas de 1mL de capacidade, com algodão nos bocais e esterilizadas;

b. Tubos de Durham;

c. Tubos indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15mL;

d. Autoclave que permita operar por 121ºC por 15 minutos;

e. Estufa bacteriológica para cultura, regulada a 36ºC, com exatidão de ± 1ºC;

f. Balança semi-analítica com sensibilidade de 0,1g;

g. Alça bacteriológica de 0,05mL;

h. Bico de Bunsen;

i. Béquer para preparo de meio de cultura;

j. Tubo de ensaio;

k. Frasco de Erlenmeyer;

l. Estante para suporte, revestida em PVC;

m. Gelo reciclável;

n. Caixas isotérmicas revestidas em PVC.

5. Execução do Ensaio

5.1. Materiais e reagentes

Caldo Verde Bile Brilhante 2% Lactose

Água destilada ou deionizada

5.2. Procedimento

5.2.1. Preparo dos meios de cultura e reagentes

5.2.1.1. Preparo de Caldo Verde Bile Brilhante – Concentrado (5% p/v). Pesar 50g do meio de cultura descrito em materiais e reagentes e adicionar a 1 litro de água destilada ou deionizada.

Agitar até dissolução completa.

Distribuir 10mL do meio de cultura já preparado em tubos indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15mL e colocar os tubos de Durhan invertidos no interior, juntamente com o meio de cultura.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, em autoclave.

Após resfriamento identificar os lotes de tubos com nome do meio, concentração e prazo de validade.

Os tubos com meio de cultura poderão ser mantidos sob refrigeração a 5ºC, conforme capítulo “Cadeia de Frio”, por até 15 dias.

Certificar-se imediatamente antes de cada utilização que os tubos de Durhan estão completamente imersos no meio de cultura e livres de bolhas de ar em seu interior.

5.2.1.2. Preparo de Caldo Verde Bile Brilhante – Simples (4% p/v)

Pesar 40g do meio de cultura descrito em 4.1 e adicionar a 1 litro de água destilada ou deionizada.

Agitar até dissolução completa.

A seguir, distribuir 9mL do meio de cultura em tubos indicados para cultura microbiológica com capacidade mínima de 15mL e adicionar os tubos de Durham invertidos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, em autoclave.

Após resfriamento identificar os lotes de tubos com nome do meio, concentração e prazo de validade. Os tubos com meio de cultura poderão ser mantidos sob refrigeração a 5ºC, conforme capítulo "Cadeia de Frio", por até 15 dias.

Certificar-se imediatamente antes de cada utilização que os tubos de Durhan estão completamente imersos no meio de cultura e livres de bolhas de ar em seu interior.

5.2.2. Validação da esterilização do meio de cultura

Após a esterilização, os tubos contendo meio de cultura deverão ser submetidos a testes de validação. Para tanto, 10% de cada lote esterilizado deve ser incubado a temperatura de 36ºC com exatidão de ± 1ºC por 24horas. A formação de gás ou turvação do meio em um único tubo desqualifica o lote produzido.

5.2.3. Coleta de material para análise

Após o tratamento térmico (pasteurização), coletar 4 alíquotas de 1ml da amostra a ser analisada. As alíquotas deverão ser coletadas em pontos diferentes do frasco.

Semear todas alíquotas de uma mesma amostra em um único tubo de cultura contendo Caldo Verde Bile Brilhante concentrado. O procedimento deverá ser conduzido com rigor microbiológico, utilizando ambiente estéril, ou campo de chama durante todo o procedimento.

Tampar os tubos contendo o leite com o meio de cultura e incubá-los a 36 ± 1ºC durante 24 a 48 horas, em estufa.

5.2.4 Cuidados com a amostra

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 com o produto para análise deverão ser em caixas isotérmicas mantendo-se as mesmas condições de Cadeia de Frio preconizadas para o LHO.

5.2.5 Determinação de coliformes totais

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

São considerados positivos para coliformes aqueles tubos que contenham em seu interior tubos de Durhan com formação de bolha (gás), no período de 24 a 48 horas de incubação.

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

5.2.6 Prova confirmatória

A prova confirmatória para presença de coliformes se faz utilizando os tubos com resultados considerados positivos.

Coletar, sob campo de chama, com auxílio da alça bacteriológica, amostra daquele tubo com presença de gás e inocular em meio Caldo Verde Bile Brilhante na concentração de 4% p/v. incubar o tubo com o meio Caldo Verde Bile Brilhante na concentração de 4% p/v e a amostra em estufa a 36 ± 1ºC, por 48 horas.

6. Resultados

6.1 Interpretação

Considera-se para resultado positivo final, aqueles frascos em que houve a formação de gás no teste confirmatório.

6.2 Valores aceitáveis

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.

Os resultados serão expressos como ausência e presença de coliformes totais.

BLH-IFF/NT- 40.11 – ANEXO I

FORMULÁRIO PARA REGISTRO DO RELATÓRIO DIÁRIO DE RESULTADOS PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS

Hospital/Instituição: _____

Laboratório de Controle de Qualidade: _____

Número do Lote de Pasteurização: _____

Número do Laudo de Controle do Laboratório: _____

Nº da amostra de leite humano pasteurizado	**Coliformes Totais (P) Presença / (A) Ausência**	**Situação (P) Próprio / (I) Impróprio**

Coleta	**Leitura**
Data: ___/___/___ Hora: ____ : ____ Responsável: _____	Data: ___/___/___ Hora: ____ :____ Responsável: _____

BLH-IFF/NT- 40.11 – ANEXO II

FORMULÁRIO PARA REGISTRO DIÁRIO CONSOLIDADO DE RESULTADOS
PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS

Data	Amostras Analisadas	Presença		Ausência	
		Número	(%)	Número	(%)
Total					

BLH-IFF/NT- 40.11 – ANEXO III

FORMULÁRIO PARA REGISTRO MENSAL DE NÃO CONFORMIDADES

Mês: _____ Ano: _____

Amostras Analisadas	Presença		Ausência	
	Número	(%)	Número	(%)