



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

RAQUEL BEZERRA JATOBÁ

ESTABELECIMENTO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O  
EQUIPAMENTO BACTCOUNT PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO  
LEITE CRU REFRIGERADO

RECIFE - PE

FEVEREIRO - 2009



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

RAQUEL BEZERRA JATOBÁ

ESTABELECIMENTO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O  
EQUIPAMENTO BACTCOUNT PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO  
LEITE CRU REFRIGERADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Severino Benone Paes Barbosa  
Conselheiros: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ângela Maria Vieira Batista  
Prof. Dr. Humberto Gonzalo Monardes  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Cristina Modesto

RECIFE - PE

FEVEREIRO – 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

J39e      Jatobá, Raquel Bezerra  
            Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipa-  
            mento Bactocount para monitoramento da qualidade do leite  
            cru refrigerado / Raquel Bezerra Jatobá. -- 2009.  
            47 f. : il.

            Orientador : Severino Benone Paes Barbosa  
            Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal  
Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia  
            Inclui bibliografia.

CDD 637.127

1. Citometria de fluxo.
  2. Contagem bacteriana
  3. Contagem padrão em placa
  4. Qualidade do leite
- I. Barbosa, Severino Benone  
II. Título

**ESTABELECIMENTO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O  
EQUIPAMENTO BACTCOUNT PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE  
DO LEITE CRU REFRIGERADO**

RAQUEL BEZERRA JATOBÁ

Dissertação defendida e aprovada em 18/02/2009 pela Banca Examinadora:

Orientador:

---

Severino Benone Paes Barbosa, Dr.  
Prof. Associado da UFRPE

Examinadores:

---

Maria José de Sena, Dr<sup>a</sup>.  
Prof<sup>a</sup>. Adjunta da UFRPE

---

Ângela Maria Vieira Batista, Dr<sup>a</sup>.  
Prof<sup>a</sup>. Associada da UFRPE

---

Edleide Maria de Freitas Pires, Dr<sup>a</sup>.  
Prof<sup>a</sup>. Associada da UFPE

UFRPE – Recife  
FEVEREIRO - 2009

A Erick, meu marido, um homem de caráter admirável, exemplo de perseverança e bondade e que sempre me incentivou nos estudos. Aquele que é minha bússola, meu companheiro e eterno amor.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a execução deste trabalho, bem como, de maneira especial as seguintes pessoas:

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu forças para conseguir alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos pais, Odete e Tarcísio, por confiarem em mim e desejarem sempre meu bem.

Aos meus irmãos: Roberta, Paulo Rogério, Manoel Sinésio e Ana Paula.

Aos meus sobrinhos, Paulo Ricardo e Ana Letícia.

Aos meus sogros, Risolene e Vital, em especial a Risolene pelo apoio aos estudos.

Ao professor Benone pela orientação e paciência.

Às professoras Ângela e Elisa, pelo incentivo.

Aos colegas de trabalho: Maria José, Omer, Agenor, Sr. Antônio, pelo apoio.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

## SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	9
2. Revisão de Literatura.....	12
2.1. Qualidade do Leite.....	12
2.2. Refrigeração.....	15
3. Método de Referência para Análise de Bactérias.....	17
4. Método de Referência Utilizando Placas Petrifilm®.....	17
5. Método de Citometria de Fluxo.....	18
6. Referências Bibliográficas.....	20
Estabelecimento de Uma Curva de Calibração Para o Equipamento Bactocount Para Monitoramento da Qualidade do Leite Cru Refrigerado.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	37
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das amostras de acordo com a contaminação bacteriana.....	29
Tabela 2. Número de amostras de cada Estado e sua distribuição de acordo com o nível de contaminação.....	30



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo hidrodinâmico de passagem e alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo.....	32
Figura 2. Alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo do equipamento Bactocount.....	33
Figura 3. Luz do laser incidindo sobre a partícula da amostra de leite corada e detecção da luminescência.....	33
Figura 4. Detecção da luminescência emitida pela partícula da amostra de leite corada.....	34
Figura 5. Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC).....	37
Figura 6. Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) utilizando-se os dados após cálculo de acurácia ( $s_{y,x}$ ).....	38
Figura 7. Intervalo de confiança de 95% entre logs IBC e UFC.....	39
Figura 8. Resíduos da equação de regressão entre logs IBC e UFC.....	40

## 1. Introdução Geral

No ano de 2007, 83% da produção mundial de leite foi proveniente de vacas, o que equivale a 560 bilhões de litros; os outros 17% foram produzidos por búfalas, cabras e ovelhas (FAO, 2009).

Entre os anos de 2000 e 2006 a produção mundial de leite cresceu em torno de 2% ao ano e essa perspectiva de crescimento tende a se manter para os próximos anos.

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, e produziu aproximadamente 27 bilhões de litros, em 2008 (EMBRAPA, 2009), apresentando um crescimento anual de 3% (IBGE, 2009) e mostra superioridade de crescimento na produção leiteira em relação aos países desenvolvidos. O quadro que compõe o cenário lácteo é representado por 90% de pequenos produtores, com produção média diária de 100 L/dia, ou seja, 32% do total produzido no país. O país oferece um grande potencial para expandir a oferta de alimentos agrícolas e pecuários devido aos recursos naturais, um exemplo é o leite a pasto com baixo custo de produção, conferindo competitividade no valor de comercialização. Outro fator que explica a expansão da produção no país é a implantação de novas tecnologias, manejo adequado e aplicação de melhoramento genético. Isto pode ser observado no aumento da produtividade que em 2008 foi, em média, 1.261 litros por vaca (IBGE, 2009). Mesmo assim, ainda há muito que se melhorar quando comparada com a produção média observada nos Estados Unidos, que alcança valores seis a sete vezes maiores.

A FAO (2009) prevê que a América do Sul será a região de maior crescimento na produção de leite e, com base em seu relatório, o Brasil deverá produzir até 8% a mais que o ano de 2008, seguido pela Argentina com 5% e 1,2% para o Uruguai.

Na Região Nordeste, a Bahia é o principal produtor de leite; na sequência vem Pernambuco, que no ano de 2007 ultrapassou 740 milhões de litros, correspondendo a

19,7% da produção regional e 2,5% do leite brasileiro. A atividade leiteira no Estado concentra-se principalmente na região leste do Agreste pernambucano (ZOCCAL, 2008).

O leite produzido no Brasil tem como principal destino o abastecimento do mercado interno, o que é prioridade, entretanto, com a possibilidade de produção excedente abre-se a perspectiva do Brasil, em curto espaço de tempo, ser um dos grandes exportadores de produtos lácteos. Junto com a produção nacional de leite, a demanda interna também aumentou como consequência do crescimento populacional, do aumento da renda *per capita* e do crescente processo de urbanização. Estes fatores imprimiram mudanças nos padrões alimentares: a população passou a consumir mais proteína de origem animal, por exemplo, leite fluido, e vários tipos de derivados. O leite é um excelente alimento por apresentar várias substâncias nutricionais essenciais ao crescimento e manutenção de uma vida saudável, além de sua importância nutricional desempenha um relevante papel social na geração de renda e empregos.

A globalização apresenta-se como grande responsável pelo aumento na veiculação de informações e produtos. O controle de qualidade torna-se essencial para garantir a SEGURANÇA dos alimentos comercializados internacionalmente. Para isto, a FAO é o principal organismo das Nações Unidas que regulamenta a exportação de alimentos e se ocupa da qualidade e inocuidade dos alimentos em todos os aspectos e em todas as diferentes etapas da produção alimentícia, desde a colheita, manipulação pós-colheita, armazenamento, transporte, até sua elaboração e distribuição.

De acordo com Brito (2008), uma das prioridades atuais requeridas pela sociedade é a disponibilidade de alimentos seguros e saudáveis, livres de resíduos de antibióticos, pesticidas e metais pesados.

Algumas medidas de segurança devem ser tomadas no processamento de alimentos e uma delas foi descrita por Rosa (2007), que em seu estudo demonstra a importância da

implantação do Sistema de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Este programa foi introduzido no Brasil em 1998. Neste processo, os produtores de alimentos devem conferir qualidade aos seus produtos evitando perigos à saúde do consumidor.

A cadeia produtiva do leite pode demonstrar sua responsabilidade com a sociedade, assumindo o compromisso com a saúde do consumidor fornecendo produtos seguros, saudáveis e competitivos no mercado internacional (BRITO, 2008).

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 51 (IN51), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), dispõe sobre os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos diferentes tipos de leite. Em julho de 2007, a IN51 entrou em vigor na região Nordeste, tornando obrigatórias as análises da matéria-prima, ou seja, do leite cru refrigerado, para todas as indústrias ou laticínios que possuam fiscalização federal e destinem seus produtos para estabelecimentos comerciais (BRASIL, 2002).

Para atender aos padrões mínimos exigidos pela IN51, o MAPA conta com a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), a qual é composta atualmente por oito laboratórios em distintas regiões do País. Os laboratórios estão munidos com equipamentos automatizados de última geração e de alto rendimento analítico. As análises realizadas nesses laboratórios são: determinação dos constituintes do leite, (gordura, proteína, lactose, sólidos totais e não gordurosos), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). O monitoramento da CBT é imprescindível e de grande importância social, pois o leite é um alimento que possui grande abrangência de consumidores, principalmente crianças e idosos.

A presente pesquisa visou estabelecer uma curva de calibração para o equipamento Bactocount IBC (Bentley Instruments ®). Para elaboração da curva de

calibração foram utilizados dados de análises de leite cru refrigerado, aplicando-os em uma análise de regressão para obtenção de uma equação, e conversão dos valores de contagem individual de bactérias (CIB) para unidade formadora de colônia (UFC) como estabelecido na IN 51 (BRASIL, 2002) e determinar o grau de associação entre os métodos de citometria de fluxo (CIB) e o de referência (UFC).

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1 Qualidade do leite**

O termo qualidade vem do latim *qualitate*, que pode ser utilizado em situações distintas, como exemplo, do ponto de vista de produção, de como ocorre o processo para obtenção do produto e se este atende às exigências dos consumidores. Outro ponto diz respeito à composição do produto, suas propriedades nutricionais, durabilidade, funcionalidade e a segurança que ele oferece.

Segundo Santos & Fonseca (2007), um leite com boas qualidades deve apresentar baixa contagem bacteriana, ausência de microrganismos patogênicos ao homem e ausência de resíduos de medicamentos.

De acordo com Martins et al. (2004), a qualidade do leite sempre foi o objetivo primordial do setor lácteo. Contudo, somente com a união e o esforço conjunto de produtores, processadores e governo aplicando políticas econômicas favoráveis ao setor é que poder-se-á produzir e garantir um leite de boa qualidade mantendo o homem no campo com dignidade e oferecendo um produto competitivo no mercado internacional (GODKIN, 2000).

Um dos requisitos para atender a qualidade do leite é a baixa carga bacteriana. De acordo com Hillerton (2000), o controle da carga bacteriana no leite inicia-se com a saúde do úbere da vaca, sendo este controle mais facilmente implementado quando se

conhece a fonte de contaminação.

A glândula mamária é constituída de um tecido muito sensível. Quando bactérias se estabelecem nestes tecidos desencadeiam um processo inflamatório conhecido como mastite, onde células de origem sanguínea se instalam para destruir o foco de infecção bacteriana. As células somáticas, em grande parte, são constituídas por neutrófilos e macrófagos.

Segundo Santos & Fonseca (2007), a mastite é considerada a principal responsável por grandes prejuízos econômicos no setor leiteiro. Provoca queda na produção de leite, gastos com medicamentos, potencial risco de contaminação para o rebanho, descarte de animais com mastite crônica.

De acordo com Brito et al. (2000), a superfície externa da teta também se apresenta como uma das principais fontes de contaminação por microrganismos do leite cru e pode servir de fonte de infecção para a glândula mamária. As condições das instalações as quais estão sujeitos os animais merecem atenção especial, principalmente para aqueles que permanecem por longos períodos com o úbere em contato com o material utilizado para o repouso dos animais.

Cuidados especiais devem ser tomados com a desinfecção das tetas antes e depois da ordenha. A utilização de soluções conhecidas como *pré-dipping* e *pós-dipping* podem prevenir a infecção da glândula mamária. Outra medida que pode ser tomada é o tratamento específico para vacas secas, evitando a mastite neste grupo de animais.

Segundo Philpot e Nickerson (2002), mais de 140 tipos de microrganismos podem causar infecções na glândula mamária, dentre os quais fazem parte desta lista, bactérias, micoplasmas, leveduras, algas, fungos e, em raras ocasiões, vírus. No entanto, as bactérias são as principais causadoras de infecções intramamárias em vacas leiteiras e, de acordo com Philpot (1998), a maioria das mastites clínicas é causada por

estreptococos, estafilococos e coliformes.

As células somáticas são oriundas da reação inflamatória do úbere de vacas infectadas e as principais são as epiteliais e as células brancas, de origem sanguínea. Além de indicadoras da saúde da glândula mamária, as células somáticas exercem um importante papel na imunidade contra a mastite.

Ainda de acordo com Philpot e Nickerson (2002), a contagem de células somáticas depende da gravidade da infecção, onde seu aumento provoca alterações na composição do leite reduzindo sua qualidade e o rendimento na produção de derivados.

Para evitar a contaminação inicial do leite, práticas profiláticas podem ser aplicadas. Segundo Guerreiro et al. (2005), a aplicação destas práticas em todo o processo de obtenção do leite proporciona diminuições significativas na contagem de bactérias psicotróficas no leite, o que comprova a importância das práticas preventivas de higiene sobre a qualidade do leite.

Considera-se o equipamento de ordenha grande fonte de contaminação do leite, onde os procedimentos de limpeza e higienização influenciam diretamente sobre o nível da carga microbiana. Os resíduos de leite que permanecem aderidos à superfície interna do equipamento de ordenha podem favorecer a multiplicação de grande variedade de microrganismos (SANTOS & FONSECA, 2007; HORST, 2006).

Os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha devem ser seguidos para evitar a proliferação de microrganismos. Para se obter um produto bacteriologicamente limpo devem ser tomados cuidados especiais com a limpeza adequada de toda superfície interna da tubulação do equipamento de ordenha (LARANJA, 1998; SPENCER, 2000).

A presença de microrganismos na água compromete a qualidade do leite. A água utilizada para a limpeza dos tetos, do equipamento de ordenha e utensílios empregados

para a obtenção do leite devem ser de boa qualidade para garantir que não ocorra contaminação proveniente da água.

Cerqueira et al. (2006) relatam em seu trabalho que se a água utilizada para obtenção do leite for de baixa qualidade, além de aumentar a CBT do leite poderá veicular patógenos de importância em saúde pública.

O leite UHT passa por um processo que destrói quase todas as células bacterianas vegetativas, pois é submetido a temperaturas de 130 a 150°C, por 2 a 4 segundos. Apesar desse tratamento, alguns esporos podem resistir e também enzimas microbianas, que permanecem ativas e degradam o leite.

Tamanini et al. (2007) observaram a presença de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes termotolerantes em amostras de leite pasteurizado, constatando a necessidade de limpeza e sanitização das superfícies que entram em contato com o leite após a pasteurização.

## **2.2 Refrigeração**

A refrigeração é uma prática utilizada para prolongar o tempo de armazenamento do leite e de seus derivados, pois o leite é perecível e necessita de procedimentos adequados para sua conservação. Deve-se salientar que a refrigeração do leite não melhora sua qualidade, apenas evita a proliferação de alguns tipos de microrganismo.

Horst (2006) comenta em seu trabalho sobre a importância da refrigeração ainda na propriedade, e sobre a manutenção da qualidade do leite, principalmente na questão da diminuição da contagem bacteriana.

Baixas temperaturas podem inibir ou reduzir a multiplicação da maioria das bactérias e também diminuir a atividade de enzimas degradativas dos componentes do leite. A estocagem adequada do leite, associada aos procedimentos de limpeza de



equipamentos de ordenha contribui para a redução da contagem de mesófilos no leite (ARCURI et al., 2006).

Com o resfriamento do leite em tanques de expansão na propriedade, as bactérias psicrotróficas predominam e os principais gêneros são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Listeria* e *Yersinia*. Estes últimos são potenciais causadores de doenças em seres humanos através da ingestão do leite e de seus derivados (SANTOS & FONSECA, 2007).

De acordo com Chen et al. (2003), várias são as bactérias contaminantes do leite cru que produzem enzimas extracelulares termorresistentes (proteases e lípases). Essas enzimas afetam a qualidade do produto final, mesmo na ausência de bactérias viáveis.

As bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, são os principais agentes causadores de mastite subclínica em grande parte dos rebanhos bovinos leiteiros, tornando-se responsáveis por altas contagens de CS que afetam a qualidade do leite (CRUZ et al., 2004).

A importância das bactérias no leite varia de acordo com sua ação sobre os constituintes do leite, conforme o tipo e até com a capacidade de se multiplicarem e continuar viáveis podendo comprometer a qualidade do leite e a saúde do consumidor.

As bactérias estão subdivididas em grupos, de acordo com suas características, e os principais são: Psicrotrófico – multiplicam-se em temperaturas abaixo de 7°C, porém, a faixa ideal fica entre 20 e 30°C; Mesófilo – desenvolvimento entre 10 e 45°C, este grupo é responsável por altas contagens quando o leite é mantido à temperatura ambiente e Termófilo – são encontradas normalmente em pequeno número, mas em determinadas situações podem atingir grandes populações e sua multiplicação está na faixa de 20 a 37°C.

### **3. Método de referência para análise de bactérias**

A contagem bacteriana total (CBT) estima o número de unidades formadoras de colônias por mililitro de leite (UFC/mL). A contagem padrão em placas (CPP) é considerada o método oficial. Este método permite a visualização de colônias bacterianas formadas em placas de Petri (BRASIL, 2003) e com este método obtém-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC). A CPP determina a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas no leite.

Para realizar essa análise, seguindo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003), distribuem-se alíquotas de leite das diluições escolhidas em placas de Petri estéreis, acrescentando-se 12 a 15 mL de agar a 48°C. Após a solidificação do gel, incubam-se as placas invertidas, de acordo com as exigências de tempo e temperatura requeridas pelo tipo de microrganismo que será quantificado. O método de referência pode subestimar a quantidade de bactérias presentes no leite, pelo fato de que somente as bactérias viáveis e que se multiplicam nas condições de incubação formam colônias. Outro aspecto que pode influenciar a subestimação da contagem em placas é a característica que algumas bactérias apresentam na sua forma de agregação (HOLM et al., 2004), ou seja, uma colônia pode ser formada por uma ou várias bactérias.

### **4. Método de referência utilizando placas Petrifilm®**

As placas Petrifilm® AC utilizadas na contagem de microrganismos são compostas por nutrientes como ágar padrão, um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólio cloreto de trifênil (TTC) que facilita a visualização das colônias.

Essa metodologia traz algumas vantagens como a eliminação do preparo de meios de cultura, evitando a variabilidade técnica e reduzindo a necessidade de utilização de equipamentos como autoclaves, banho-maria, grandes espaços em estufas de incubação e

economia com gastos de energia.

Estudos avaliando a correlação entre o sistema Petrifilm com o método tradicional apresentaram bons resultados. Coeficientes de correlação de 0,97 e 0,99 foram encontrados por Blackburn et al. (1996) e Souza et al. (2005), respectivamente, indicando alto grau de associação entre os métodos. Estes resultados mostram que o sistema Petrifilm é um método apropriado e uma alternativa conveniente ao método padrão para a quantificação de bactérias (AOAC, 2002).

## **5. Método de citometria de fluxo**

O citômetro de fluxo é um equipamento que quantifica células em suspensão, permitindo uma análise rápida (150 amostras/hora) e objetiva, avaliando a emissão de fluorescência de células coradas com fluorocromos (NINANE, 2000; BROUTIN, 2004; NAKAGE, 2005; BARRIENTOS et al., 2000).

A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada para analisar células de origem animal, vegetal ou microbiana, desde que estas se encontrem em suspensão.

O citômetro constitui-se de uma câmara de fluxo, fonte de laser, bancada óptica e computador. Para a realização da análise do leite, a amostra passa por um tratamento que consiste da adição de brometo de etídio (corante específico para DNA e RNA), a fim de que o ácido nucléico da bactéria seja intercalado com este corante, conferindo-lhe luminescência ao passar pela luz do laser. Uma alíquota da amostra (500 µL) apresentando-se em suspensão na solução, que é composta por corante e outras substâncias, segue por um capilar e encaminha a mostra para a câmara de fluxo, que alinha as células uma a uma. A fonte do laser é direcionada para o local de passagem das partículas coradas; a luz que intercepta as partículas provoca emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características da célula. Ao passar por esse feixe de luz,

cada bactéria emite luminescência, que é captada pelo sistema óptico, transformando a incidência luminosa de pulsos elétricos (sistema analógico) em números (sistema digital), por meio de um computador acoplado a estes sistemas (BARRIENTOS et al., 2000; GUNASEKERA et al., 2000; BROUTIN, 2004). Com isso, o número de bactérias é determinado, sendo expresso em unidade individual de bactérias (CIB) e convertido a unidade formadora de colônia (UFC) mediante equação introduzida ao programa de análise.

Holm et al. (2004) citam que a citometria de fluxo é uma alternativa viável para substituir a metodologia tradicional, tanto pela maximização da eficiência na estimativa da população microbiana, quanto na redução do tempo no processo de análise. Em seu estudo, Holm et al. (2004) avaliaram um equipamento similar ao Bactocount IBC, que apresenta em seus gráficos os resultados de alguns grupos de bactérias (bactérias associadas à higiene, psicrotróficas e bactérias associadas a mastite) obtendo a seguinte equação  $\log\text{UFC} = 3,13 + 0,49 * \log\text{IBC}$ .

A determinação da contagem bacteriana total realizada por citômetro de fluxo apresenta alto rendimento analítico. Outro fator importante é a utilização do conservante bacteriostático (AZIDIOL) que reduz a atividade metabólica das bactérias, prolongando a vida útil das amostras destinadas à análise de CBT. No Brasil utiliza-se o azidiol nas formas líquida ou em pastilha. Por se tratar de um conservante com propriedades cancerígenas, a forma de pastilha proporciona maior segurança no manuseio para coleta da amostra.

## 6. Referências Bibliográficas

- ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n 3, p. 440-446, 2006.
- BARRIENTOS, A. A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000.
- BLACKBURN, C. W.; BAYLIS, C. L.; PETITT, S. B. Evaluation of petrifilm™ methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in a wide range of foods. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.137-140, 1996.
- BRITO, J. R. F.; PAIVA E BRITO, M. A. V.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n.5, p.847-850, 2000.
- BRITO, J. R. F. Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p. 129-143.
- BROUTIN, P. Contagem Individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. p.317-331.
- CERQUEIRA, M. M. O.; PICININ, L. C. A.; FONSECA, L. M.; et al. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006. p. 273-289.

CHEN. L.; DANIEL. R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase in milk powders. **Dairy Journal**, v. 13, p.255-275, 2003.

**Codex Alimentarius**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.net>> Acesso em: 14/01/09.

CRUZ. J. C.; MOLINA, L. R.; BRITO, J. R. F. et al. Eficiência da blitz terapia na erradicação de *Streptococcus agalactiae* e controle de *Staphylococcus aureus* em rebanhos bovinos leiteiros. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. p.137-140.

DÜRR, J. W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. p.38-55.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.cnpq.com.br/estatística>> Acesso em: 14/01/09.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação. **Documento Perspectivas Alimentares**. Disponível em: <<http://www.fao.org/pr>> Acesso em: 14/01/09.

GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2000. p.9-20.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C. et al. Qualidade microbiológica do leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências Agrotecnologia**, v. 29, n.1, p.216-222, 2005.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D.A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and**

**Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.

HILLERTON, E. Contagem Bacteriana no leite: Importância para a indústria e medidas de controle. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2000. p.59-65.

HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.935-941, 2004.

HORST, J. A. Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006. p.163-174.

IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>> Acesso em: 14/01/09.

LARANJA, L. F. Qualidade do Leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistemas de resfriamento. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p.54-56.

MAPA **Instrução Normativa nº 51**, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.13, 21 de setembro de 2002, pág. 90.

MAPA. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.14, 18 de setembro de 2003.

MARTINS, P. C.; YAMAGUCHI, L. C. T.; ARCURI, P. B. et al. Pagamento por qualidade no Brasil: motivação e obstáculos. In: Congresso Brasileiro de

- Qualidade do Leite, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. p. 87-104.
- NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.966-973, 2005.
- PHILPOT, W. N. Programas de qualidade do leite no mundo. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p.1-8.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo. Ed. Milkbizz. p.188, 2002.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Editora Manole. Barueri. p. 314, 2007.
- SOUZA, G. B.; TAMAGNINI, L. M.; GONZALEZ, R. D. et al. Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic in crottin goat's cheese. **Revista Argentina de Microbiologia**, p.214-216, 2005.
- SPENCER, S. B. A importância e procedimentos para a limpeza e higienização de equipamentos de leite. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2000. p.53-58.
- TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A. et al. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na Região Norte do Paraná. **Ciências Agrárias**, v.28, n.3, p.449-454, 2007.
- ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V.; JUNQUEIRA, R. et al. A nova pecuária leiteira. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do leite, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife, 2008. Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p.85-95.



## **ESTABELECIMENTO DE UMA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O EQUIPAMENTO BACTCOUNT PARA MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE CRU REFRIGERADO**

Resumo: O experimento foi conduzido no Laboratório de Qualidade do Leite, Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE, situado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Objetivou-se estabelecer uma curva de calibração para o equipamento Bactocount IBC, que realiza contagem individual de bactérias (CIB) no leite, o qual deverá expressar os resultados em unidade formadora de colônia (UFC), preconizado pela IN 51 (MAPA, 2002). A UFC é um dos parâmetros de monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado de maior importância, uma vez que, a microbiota existente pode servir como veículo para doenças transmissíveis ao homem. Foram coletadas 169 amostras de leite de tanques de expansão e de latões de quatro Estados da região Nordeste e, em seguida, acondicionadas em recipientes estéreis com capacidade para 50 mL e conservadas a 4°C ( $\pm 1$ ) até a realização das análises, que não ultrapassou 48 horas. Após a análise no equipamento Bactocount IBC, as amostras foram encaminhadas para determinação de UFC utilizando-se o método de referência com placas Petrifilm® AC (AOAC, 2002; BRASIL, 2003). A curva de calibração foi construída com dados obtidos do contador individual de bactérias (CIB) comparando-os com os resultados do método de referência em UFC. Foi aplicada uma análise de correlação e posteriormente de regressão linear simples. A correlação entre CIB e UFC observada foi de 0,98 e a equação obtida foi a seguinte:  $\log UFC = -0,6324 + 1,102 * \log IBC$ .

Palavras-chave: citometria de fluxo, contagem bacteriana total, contagem padrão em placa, qualidade do leite cru

## **ESTABLISHMENT OF A CALIBRATION CURVE FOR THE BACTOCOUNT EQUIPMENT TO MONITORING REFRIGERATED RAW MILK QUALITY**

Abstract: The experiment was conducted at PROGENE laboratory in the Rural Federal University of Pernambuco. The aim of this paper was to develop a calibration curve for the Bactocount IBC equipment. This equipment perform the individual counting of bacteria in milk, but it is necessary to express the results of this counting in colonies formed per unit (CFU). The CFU is one of the most important parameters indicating the quality of the raw milk because milk may carry a variety of microorganisms that can infect humans. 169 samples were collected from bulk milk from four states of Northeast region of Brazil and stored in a sterile device at 4°C and brought to the laboratory. After the analysis in Bactocount equipment, the analysis by the CFU method was performed by using the standard count in Petri dish. A calibration curve was constructed with data from Bactocount equipment compared to the CFU method. It was applied a correlation analysis and a linear regression. The correlation between Bactocoun and CFU was 0,98 and equation generated was  $\log(\text{CFU}) = -0,6324 + 1,102 * \log(\text{IBC})$ .

Key worlds: count bacterial total, flow cytometry, quality of raw milk, standard count plate

## Introdução

Segundo a Instrução Normativa Nº 51 (BRASIL, 2002), entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.

O leite é constituído de água, proteína, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais e seu pH próximo da neutralidade que o torna um excelente meio de cultura para o crescimento de muitos microrganismos (ARCURI et al., 2006; BROUTIN, 2004). Ao ser sintetizado nos alvéolos, o leite é considerado praticamente estéril, porém, ainda na glândula mamária pode ser contaminado, principalmente por bactérias. Após a sua retirada, a pele do úbere e tetos, a superfície interna de equipamentos de ordenha e utensílios utilizados durante o armazenamento no tanque de expansão se constituem como fonte adicional de contaminação. Desta forma, a saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente que a vaca fica alojada e os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha são fatores que afetam diretamente a contaminação bacteriana no leite cru (SANTOS & FONSECA, 2007).

Segundo Lorenzetti (2006), a quantidade de microrganismos no leite cru constitui um importante indicador de sua qualidade e pressupõe tanto a saúde da vaca quanto a higiene durante a ordenha. A forma de obtenção do leite pode causar alterações indesejáveis comprometendo sua qualidade e de seus derivados; de modo que as boas condições de obtenção são importantes para evitar o desenvolvimento de microrganismos que ocasionam sua deterioração tornando-o impróprio para o consumo humano.

Portanto, a qualidade microbiológica do leite é um dos parâmetros de maior importância, uma vez que o mesmo pode servir de veículo para vários microrganismos

patogênicos à saúde humana (ARAÚJO, 1998), como exemplo, os causadores da brucelose e tuberculose, reconhecidas como zoonoses clássicas. Outro exemplo é a *Campylobacter jejuni* que pode causar sequelas neurológicas e articulares graves em humanos acometidos por esta espécie (VASCONCELLOS, 2006).

Para avaliar a qualidade bacteriológica do leite várias tecnologias têm sido desenvolvidas para obtenção de resultados analíticos rápidos, e uma delas é a citometria de fluxo (HOLM et al., 2004). O método eletrônico para contagem bacteriana no leite que utiliza a técnica de citometria de fluxo permite a contagem individual de bactérias (CIB) presente na amostra. Tal contagem é possível mediante a adição de solução contendo brometo de etídio, corante que intercala ao DNA da bactéria (GONZALO et al., 2003; NINANE et al., 2000).

Para análise de rotina, é adicionado à amostra de leite um conservante bacteriostático, que reduz a atividade metabólica das bactérias presentes na amostra. Atualmente, o conservante utilizado é o azidiol, cujo princípio ativo é azida sódica 0,1%. As amostras contendo conservante e acondicionadas a uma temperatura média de 4°C permanecem inalteradas, portanto adequadas para análise até dez dias após a coleta (LEITE, 2006).

No método de referência estabelecido pelo MAPA, para a contagem bacteriana total (CBT), uma alíquota de leite (1 mL) é distribuída em placa de Petri contendo meio de cultura e, em seguida, incubada a 30°C, por 72 horas (International Dairy Federation, 1991). Bactérias viáveis e que se multiplicam nessas condições desenvolvem colônias que são enumeradas, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônia (UFC).

O limite legal para CBT, descrito na Instrução Normativa N° 51 (BRASIL, 2002) foi estabelecido apenas em UFC. Desta forma, fez-se necessário desenvolver uma curva

de calibração a partir de uma equação de regressão correlacionando os resultados dos métodos de referência e o eletrônico, com a finalidade de converter os resultados expressos de CIB para UFC.

Pesquisa realizada no Brasil por Cassoli (2008), utilizando um equipamento semelhante, testou duas curvas de calibração para avaliar a necessidade de utilizá-las em diferentes épocas do ano (chuva ou seca), os resultados mostraram ser possível utilizar apenas uma curva para qualquer uma das épocas.

Várias pesquisas têm apontado boa correlação entre o método automatizado e o de contagem bacteriana em placas, entretanto, é enfatizado a importância de utilizar-se grande número de amostras de leite, a fim de reduzir ou, até mesmo, isolar os efeitos do ambiente que possam interferir na estimativa da correlação (NINANE et al., 2000; SUHREN et al., 1999).

De acordo com Broutin (2004), na Europa têm sido adotadas diferentes estratégias de adequação para a citometria de fluxo, onde alguns países assumem uma única equação de calibração para todos os equipamentos, e outros utilizam uma equação de calibração para cada laboratório.

Diante do exposto, os objetivos da presente pesquisa foram estabelecer uma equação de regressão que converta os valores obtidos pela técnica de citometria de fluxo em UFC utilizando os dados de contagem de bactérias de amostras de leite oriundas de tanques de expansão e latões de vários Estados da região Nordeste e determinar o grau de associação entre os métodos de referência do MAPA (UFC) e o de citometria de fluxo (CIB).

## Material e Métodos

Foram coletadas 322 amostras de leite *in natura*, previamente homogeneizadas, oriundas de tanques de expansão e latões, provenientes de laticínios, cooperativas e fazendas leiteiras que enviam suas amostras ao Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Observa-se na Tabela 1, a distribuição das amostras de acordo com o nível de contagem bacteriana e o percentual a que cada uma corresponde em uma análise geral dos dados.

Na Tabela 2, apresenta-se a distribuição das amostras de acordo com o nível de contagem dentro de cada Estado de origem.

Tabela 1. Distribuição das amostras de acordo com a contaminação bacteriana

Contagem Individual de Bactéria (mil/mL)	Número de amostras	%
0-100	63	19,56
101-500	41	12,74
501-1.000	27	8,38
> 1.000	191	59,32
Total	322	100

A maior concentração de amostras com contagem bacteriana acima de 1.000 x 10<sup>6</sup> fez com que houvesse dificuldade na padronização da curva de calibração, uma vez que, este fato influencia diretamente com a leitura do equipamento.

Tabela 2. Número de amostras de cada Estado e sua distribuição de acordo com o nível de contaminação

Estado	Contagem Individual de Bactéria (mil/mL)				Total
	0-100	101-500	501-1.000	> 1.000	
AL	-	-	2	63	65
PB	-	-	2	26	28
PE	58	37	20	78	193
RN	5	5	2	24	36
Total	63	42	26	191	322

O período de coleta foi realizado entre os meses de agosto de 2007 e outubro de 2008. Na presente pesquisa, foram analisadas amostras de leite de vaca, provenientes de ordenhas manual e mecânica. A estrutura das amostras representou a rotina de trabalho desde a coleta do leite pelos laticínios e fazendas até a análise no laboratório (TOMASKA et al., 2006).

Após a homogeneização do leite cru nos tanques ou latões, as amostras foram depositadas em recipientes estéreis com capacidade para 50 mL e acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável permanecendo sob refrigeração a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  durante todo o trajeto até o laboratório do PROGENE. O tempo transcorrido entre a coleta e a chegada ao laboratório não ultrapassou 24 horas. Na recepção do laboratório, a temperatura das amostras foi verificada, e estas foram em seguida armazenadas sob refrigeração a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise. O tempo entre a coleta do leite e a análise laboratorial não ultrapassou 48 horas e, entre a análise do CIB e do método de referência, foi de no máximo quatro horas.

## **Análise laboratorial**

### **Método eletrônico**

Para análise pelo método eletrônico, foi utilizado o equipamento Bactocount IBC (Bentley Instruments ®, 2004), que emprega a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica consiste em: sistema óptico, tubos fotônicos, laser (luz verde visível a um comprimento de onda de 532 nm e infravermelho de 800-1100 nm), um detector de pulsos, conversor do sistema analógico para o digital e um computador para processamento dos dados.

Imediatamente, após os procedimentos de checagem do equipamento Bactocount IBC, iniciaram-se as análises. As amostras foram homogeneizadas manualmente e alinhadas em um rack na esteira do equipamento. Em seguida, cada amostra passou por uma agitação automática antes de ser succionada uma alíquota de leite, que foi depositada em uma das células do carrossel, constituído de 33 cavidades e aquecido a 50°C. A alíquota é incubada em solução clarificante contendo 90% de tampão, 5% de corante a base de brometo de etídio (corante químico fluorescente específico que intercala ao cromossomo bacteriano por possuir afinidade com bases nucleicas) e 5% de uma enzima proteolítica. Esta solução reduz os constituintes suscetíveis de interferência (proteínas, células somáticas, glóbulos de gordura) durante o procedimento de análise (NINANE et al., 2000; GUNASEKERA et al., 2000). Na sequência, a alíquota passou por dois períodos de homogeneização (sonificação). Os bastões homogeneizadores consistem de uma haste com ultra-som acoplado que dispersa os constituintes e homogeneiza a amostra em dois momentos durante a incubação (Bentley Instruments ®, 2004). São necessários 10 minutos para que a enzima proteolítica atue sobre a proteína e, também, para que os outros constituintes da solução de incubação destruam os



interferentes da amostra. Esse tempo também é suficiente para adesão do corante ao DNA bacteriano. As células bacterianas coradas são injetadas em um capilar por processo de hidrodinâmica (Figura 1), passando pela câmara de fluxo (Figura 2) que alinha as partículas coradas, submetendo-as continuamente à incidência da luz do laser.

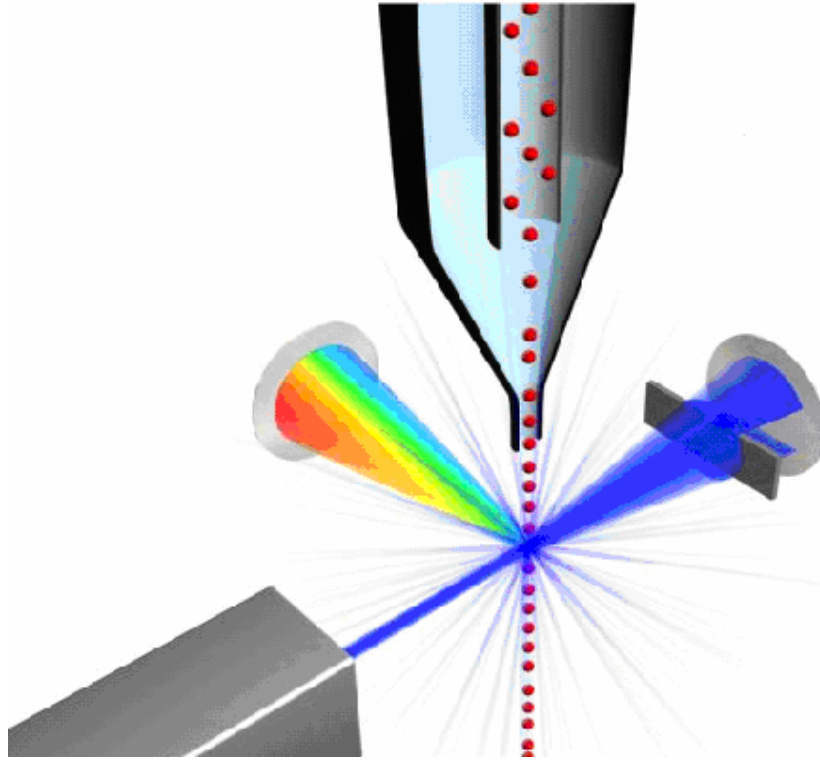


Figura 1. Processo hidrodinâmico de passagem e alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo

FONTE: [www.invitrogem.com.br](http://www.invitrogem.com.br)

Ao passar por esse feixe de luz, cada partícula corada emite fluorescência e tubos fotônicos captam a luz (Figura 3). A luminescência gera pulsos que são captados pelo sistema óptico sendo reconhecido como uma unidade individual. Os pulsos são convertidos em sinais, mediante transformação do sistema analógico para o digital, possibilitando a avaliação dos resultados automaticamente na tela do computador (BARRIENTOS et al., 2000; BROUTIN, 2004; GUNASEKERA et al., 2000).

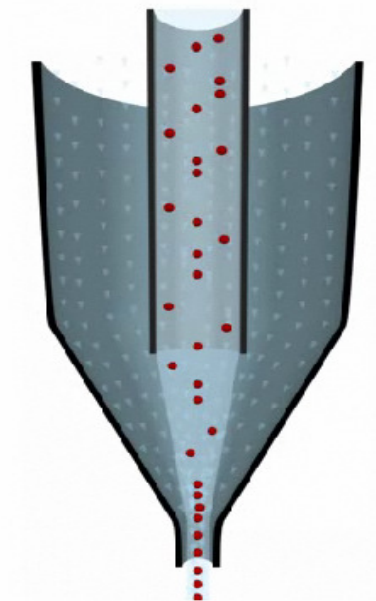


Figura 2. Alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo do equipamento Bactocount

FONTE: [www.invitrogem.com.br](http://www.invitrogem.com.br)

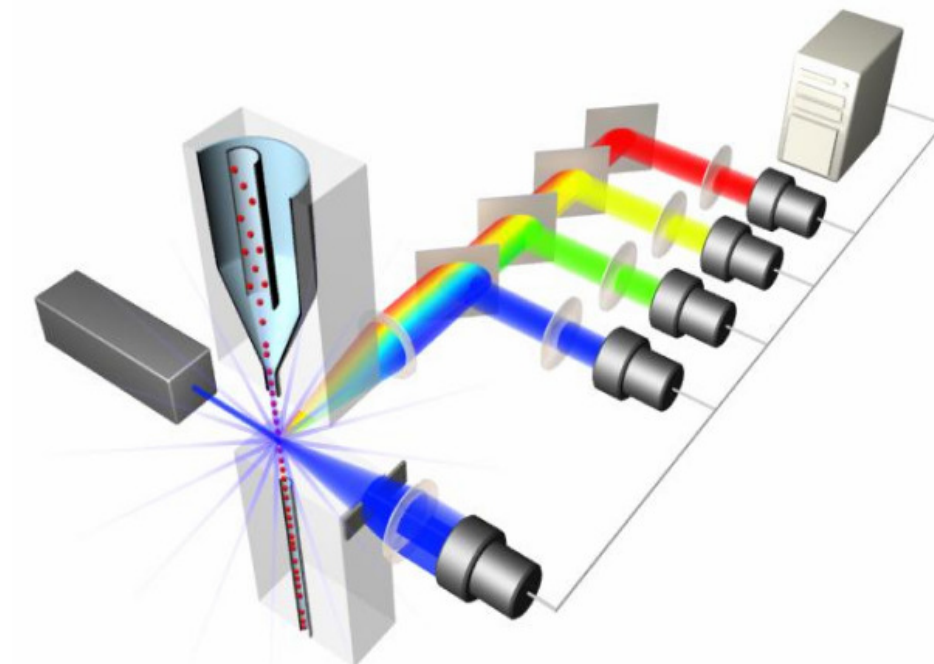


Figura 3. Luz do laser incidindo sobre a partícula da amostra de leite corada e detecção da luminescência

FONTE: [www.invitrogem.com.br](http://www.invitrogem.com.br)

Segundo Bertho (2001), a intensidade e largura dos pulsos fluorescentes são registrados e utilizados como parâmetro de contagem (Figura 4); com isso, o número de

cromossomos é determinado, considerando-se, portanto, que tal leitura irá contabilizar precisamente o número exato de bactérias, em tempo real, expresso em contagem individual de bactérias (CIB).

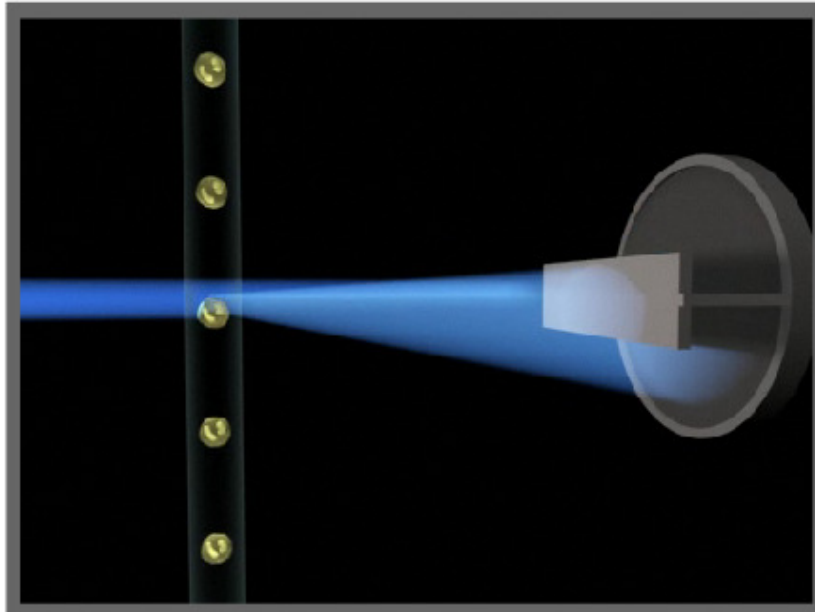


Figura 4. Detecção da luminescência emitida pela partícula da amostra de leite corada

FONTE: [www.invitrogem.com.br](http://www.invitrogem.com.br)

Após a análise no Bactocount IBC, o recipiente com a amostra foi imediatamente fechado e armazenado em refrigerador a 4°C para posterior análise pelo método de referência de contagem padrão em placa (CPP) que não ultrapassou quatro horas após análise no equipamento Bactocount IBC. Todas as amostras foram analisadas em duplicidade.

#### **Método de referência para contagem bacteriana total**

Com base nos resultados expressos em CIB, foi decidida a diluição de cada amostra a ser submetida para análise pelo método de referência IN62 (BRASIL, 2003).

Foi utilizado o método 986.33, utilizando as placas Petrifilm® AC para contagem de aeróbios (AOAC, 2002). O meio diluente utilizado foi água peptonada (Merk), na concentração de 0,1%, de acordo com a IN62 (BRASIL, 2003), acondicionada em tubos de ensaio, previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 1 atm. Em cada tubo de ensaio foi colocado 9,0 mL de água peptonada. Para diluição, o primeiro tubo de ensaio recebeu 1,0 mL da amostra de leite previamente homogeneizada em vórtex, sendo esta a diluição  $10^{-1}$ . Desta diluição retirou-se 1,0 mL e adicionou-se a outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL da solução diluente, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . Diluições subsequentes foram realizadas, da mesma forma, até a diluição previamente definida com base nos resultados obtidos do equipamento Bactocount IBC. Sob a película no centro da placa Petrifilm® AC, foi depositado 1,0 mL da amostra diluída. Com a ajuda de um difusor específico, a amostra foi distribuída uniformemente. Após um minuto de repouso, tempo suficiente para formação do gel, as placas foram incubadas na posição horizontal com o lado da película transparente para cima, em estufa com temperatura de 35°C, por 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e realizou-se a contagem das colônias. Seguindo orientação do fabricante, as placas que apresentaram valores com diferença entre duplicatas que ultrapassaram 30% foram descartadas, segundo instruções do manual de 3M®.

### **Análise estatística**

Os valores de contagem individual de bactéria (CIB) e unidade formadora de colônia (UFC) foram convertidos para logaritmo de base dez.

Foram utilizados os procedimentos estatísticos PROC CORR e PROC REG (SAS, 2002), para as análises de correlação e regressão linear, considerando-se o logIBC como

variável independente e o logUFC como variável dependente. Foi utilizado, também, o Programa Microsoft Excel® 2002 (Microsoft, USA), para organização de uma planilha e transformação dos valores de CIB e UFC para logaritmo de base 10.

A acurácia do equipamento foi expressa pelo erro do desvio-padrão do logUFC ( $s_{y,x}$ ), (IDF 128, 1999).

## Resultados e discussão

Inicialmente, foi realizada uma análise geral com os dados (322) para uma avaliação das informações obtidas. A partir destes dados, obteve-se a seguinte equação de regressão:  $\log\text{UFC} = - 2,2228 + 1,3429 * \log\text{IBC}$ , com coeficiente de determinação de 0,876. A correlação estimada entre os  $\log\text{UFC}$  e  $\log\text{IBC}$  foi de 0,93.

Na Figura 5, está representado o gráfico referente à equação de regressão para todos os valores observados dos  $\log\text{UFC}$  e  $\log\text{IBC}$ .

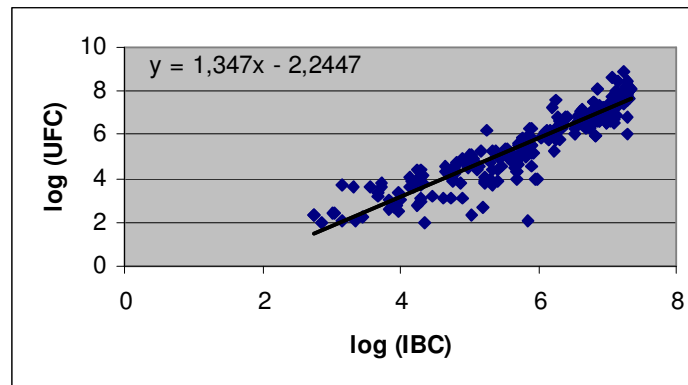


Figura 5. Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC)

Segundo orientação do fabricante do equipamento, só devem ser utilizados dados com diferença de até  $\pm 0,44$  entre os  $\log\text{IBC}$  e  $\log\text{UFC}$ . Este valor é obtido com base no erro do desvio-padrão ( $s_{y,x}$ ) e multiplicado por  $\pm 1,96$  (IDF 128, 2006). Quando se trabalha com valores em logaritmo, qualquer desvio pode alcançar uma grande dimensão dos valores reais, para mais ou para menos; desta forma, os dados que ultrapassam  $\pm 0,44$  de diferença entre logaritmos são considerados *outlier*.

Na presente pesquisa, o valor de ( $s_{y,x}$ ) foi de 0,23. Este valor está abaixo daqueles observados por Cassoli et al. (2008), quando trabalhou com amostras de leite obtidas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais ( $\pm 0,31$ ), e por Ninane et al. (2000) e Suhren

et al. (2000), que observaram valores variando de 0,25 a 0,30, respectivamente, em trabalhos realizados na Europa. Por outro lado, o valor obtido do erro do desvio-padrão é superior ao valor obtido por Trossat et al. (2002), de  $\pm 0,17$  logUFC/mL.

Multiplicando-se o erro do desvio padrão que foi  $\pm 0,23$  logUFC/mL por 1,96 (IDF 128, 2006), foram definidos outros dados da planilha com o intervalo entre logIBC e logUFC, dentro do limite de  $\pm 0,44$ , resultando em 169 observações.

Com base nesse critério, uma nova avaliação foi realizada e resultou na seguinte equação de regressão:  $\log\text{UFC} = - 0,6324 + 1,102 * \log\text{IBC}$  com coeficiente de determinação de 0,96, onde podemos observar na Figura 6 a relação de dependência linear envolvendo os logs IBC e UFC.

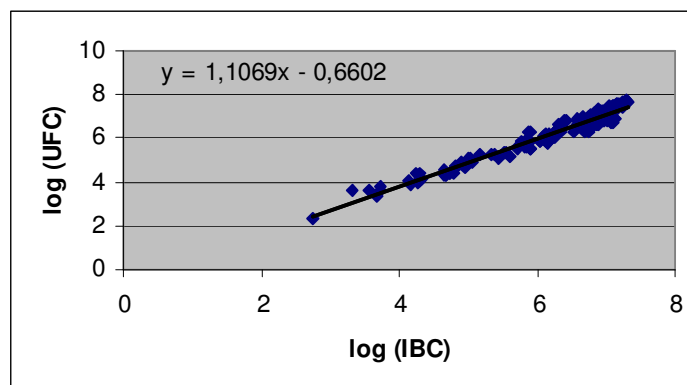


Figura 6. Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) utilizando-se os dados após cálculo de acurácia ( $s_{y,x}$ ).

Na figura 7, podemos observar o gráfico apresentando o limite de confiança de 95% para os dados utilizados.

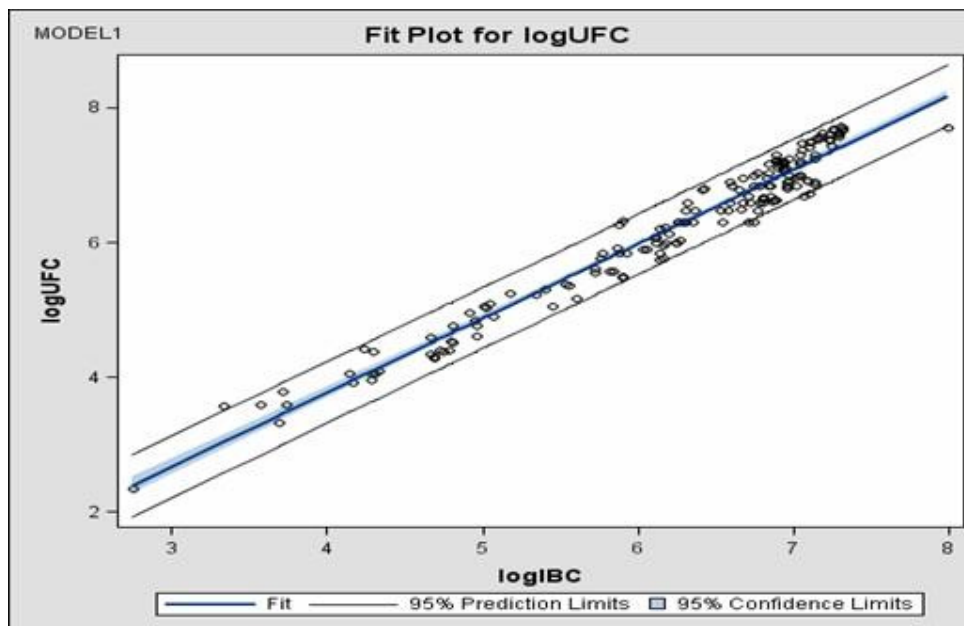


Figura 7. Intervalo de confiança de 95% entre log IBC e log UFC.

A análise dos resíduos da equação de regressão demonstra uma maior concentração de altas contagens bacterianas. De acordo com Suhren e Reichmuth (2000), altas contagens são um indicativo de que bactérias Gram-negativas estão presentes em maior quantidade no leite, o que poderia estar subestimando os resultados obtidos pelo equipamento. Por outro lado, ainda de acordo com esses autores, a predominância de bactérias Gram-positivas, definidas pela baixa concentração, irá superestimar os resultados do equipamento, quando comparado ao método de referência, como podemos observar na figura 8.



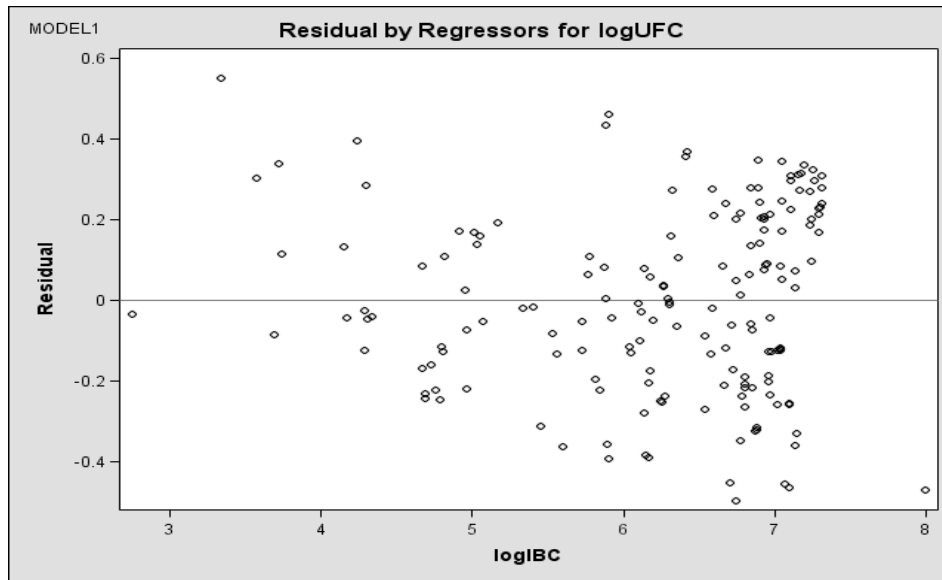


Figura 8. Resíduos da equação de regressão entre log IBC e log UFC

Para calibrar o equipamento espera-se que as amostras representem bem as características da microbiota do leite que normalmente é analisado no laboratório.

O desenvolvimento de bactérias mesófilas aeróbias na placa de Petri depende de parâmetros como espécie bacteriana, condições de cultura, agregação, estado fisiológico e injúrias a que foram submetidas as amostras (HOLM, 2004; SUHREN e REICHMUTH, 2000). A utilização de amostras com diferentes níveis de contagem bacteriana é fundamental para que a equação de calibração seja aplicável em diferentes situações abrangendo desde baixas até altas contagens de forma homogênea (BROUTIN, 2004; GUNASEKERA et al., 2003; SUREHN et al., 2000).

A equação de regressão para o citômetro de fluxo é variável de acordo com o local onde está sendo desenvolvido o trabalho. Gunasekera et al. (2000), em trabalho realizado na Austrália, obtiveram a equação  $\log\text{UFC} = -0,9822 + 1,2913 * \log\text{IBC}$ , enquanto Bolzoni et al. (2000), na Itália, obtiveram  $\log\text{UFC} = -0,9078 + 0,495 * \log\text{IBC}$ . No Brasil, Cassoli et al. (2008) e a EMBRAPA-CNPGL, analisando leite de tanque de expansão, obtiveram as seguintes equações:  $\log\text{UFC} = 1,4617 + 0,7224 *$

$\log\text{IBC}$  e  $\log\text{UFC} = -1,9274 + 0,783 * \log\text{IBC}$ , respectivamente. Na presente pesquisa a equação obtida foi  $\log\text{UFC} = - 0,6324 + 1,102 * \log\text{IBC}$ , grande diferença entre equações pode refletir provavelmente a diversidade dos tipo de microrganismos existentes em cada região.

O método de referência é recomendado pelo MAPA (BRASL, 2002), pois é uma metodologia aceita internacionalmente. Entretanto, mesmo este método sendo reconhecido internacionalmente, a aceitação de novas tecnologias que maximizam o rendimento das análises devem ser aceitas após sua devida validação. Isto ocorre com a técnica de citometria de fluxo empregada para contagem bacteriana total, que apresenta um alto grau de correlação com o método de referência, como o caso aqui descrito.

Na presente pesquisa a correlação estimada entre os métodos de citometria de fluxo e o método de referência foi de 0,98, o que representa um alto grau de associação entre as duas metodologias. Este valor é superior aos encontrados por Tomaska et al. (2006) e Cassoli et al. (2008), que estimaram valores de 0,87 e 0,81, respectivamente, entre as duas metodologias. Em revisão, Broutin (2004) relatou que valores de correlação entre o método de referência e o de citometria de fluxo, verificados em trabalhos desenvolvidos em outros países, variaram entre 0,90% e 0,98%.

A grande variação de resultados obtidos através do método de referência em UFC envolve uma série de fatores como a espécie bacteriana prevalente na região, em que está sendo avaliada a pesquisa, as condições do meio de cultura, a agregação e o status metabólico das bactérias e injúrias que a amostra tenha sofrido (SUREHN e REICHMUTH, 2000). Portanto, os resultados apontam para a necessidade da utilização de curvas regionalizadas devido às características próprias de cada região.

Hanus (2004), ao aplicar teste de proficiência em laboratório leiteiro na Slovakia, observou que a calibração periódica de equipamentos que utilizam a técnica de

infravermelho mantém sua estabilidade, além de proporcionar uma maior precisão nos resultados das análises servindo para aumentar a detecção de não conformidade das análises de rotina do leite, determinar as correções dos erros acidentais do equipamento, aumentando, portanto, a confiabilidade dos resultados. Este exemplo também serve como parâmetro para a calibração do citômetro de fluxo, pois novos dados serão inclusos mensalmente no programa de calibração. A adição de novas leituras periódicas servirão para acompanhar as mudanças que a microbiota apresenta, como resultado de mudanças climáticas e os tipos de bactérias que se predominam em cada estação, também a estabilidade do equipamento. Desta forma, o equipamento poderá ser atualizado sempre que as mudanças ocorram.

## Conclusões

Foi determinada uma curva de calibração para o equipamento Bactocount IBC,  $\log\text{UFC} = -0,6324 + 1,102 * \log\text{IBC}$ ; novos dados poderão ser adicionados, sempre que necessários, a fim de que a curva de calibração possa representar a real situação do momento.

O coeficiente de correlação estimado, denotando alto grau de associação entre os métodos de contagem bacteriana por AOAC 986.33 e citometria de fluxo, permite concluir que o equipamento Bactocount pode ser utilizado como método alternativo para contagem bacteriana total em leite cru refrigerado.

## Referências bibliográfias

- ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Bazilian Journal Veterinari Res. Animal Science**. São Paulo, v.35, n.4, p.161-165, 1998.
- ARCURI, E. F.; BRITO, J. R, F.; PINTO, S. M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n 3, p. 440-446, 2006.
- AOAC. Bacterial and coliform counts in milk: **Dry rehydratable film methods**. Sec.17.3.02, Method 986.33. In official methods of analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> ed., P. A. Cunniff (Ed.); AOAC International, Gaithersburg, MD, 2002.
- BARRIENTOS, A. A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000.
- BENTLEY INSTRUMENTS. Bactocount IBC: **Operator's manual**. Chaska, p.121, 2004.
- BERTHO, A. L. Citometria de fluxo, Rio de Janeiro. FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.fiocruz.com.br>> Acesso em: 12/01/09.
- BOLZONI, G.; MARCOLINI, A.; VARISCO, G. Evaluation of the bactoscan FC 1. Accuracy, comparison with the bactoscan 8000 and somatic cells effect. **Milchwissenschaft**. v.55, n.2, p.67-70, 2000.
- BRASIL **Instrução Normativa nº 51**, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.13, 21 de setembro de 2002,

pág. 90.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p.14, 18 de setembro de 2003.

BROUTIN, P. Contagem Individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. p.317-331.

CASSOLI, L. D; MACHADO, P. F.; RODRIGUES, A. C. O. et al. Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw Milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48, 2008.

GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRLEDO, J.A. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.1, p.138-145, 2003.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D.A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.

GUNASEKERA, T. S.; VEAL, D. A.; ATTFIELD, P. V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.269-279, 2003.

HANUS, O.; GENCUROVÁ, V.; HERING, P. et al. Diagnostic use of proficiency testing in dairy laboratory. **Acta Agriculturae Slovenica**, p.37-42, 2004.

- HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.935-941, 2004.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products: enumeration of microorganisms. **IDF Standard**, 100 B, p.3, 1991.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and products: definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. **IDF Standard**, 128 A, p.12, 1999.
- LEITE, M. O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. Belo Horizonte: Universidade Federal Rural de Minas Gerais, 2006. 62p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Minas Gerais, 2006.
- LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da Região Sul**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006. p.71. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, 2006.
- NINANE, V.; REU, K.; OGER, R. et al. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v.80, p.527-538, 2000.
- ROSA, L. S.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.422-430, 2007.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Editora Manole. Barueri. 314 p. 2007.

SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Milchwissenschaft**, v.50, n.3, p.249-275, 1999.

SUHREN, G. e REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**. v.55, p.18-22, 2000.

TOMASKA, M.; SUHREN, G.; HANUS, O. et al. The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality of raw sheep's milk in Slovakia. **Lait**. v.86, p.127-140, 2006.

TROSSAT, P. H.; LERAY, E.; ROLLIER, P. Evaluation of bactoscan FC. **Cecalait**, 2002.