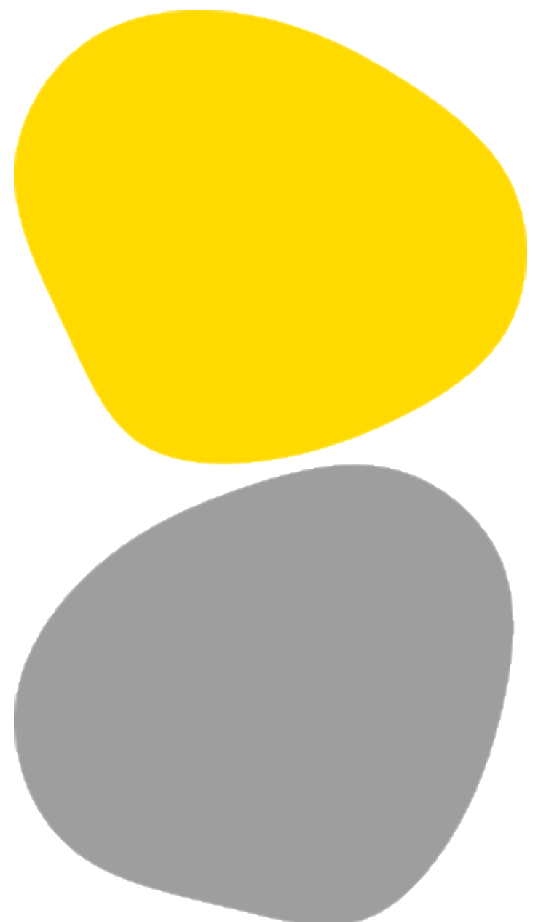




Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó

Cristiana Teixeira Vaz da Silva

09/2025





Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó

Autor

Cristiana Teixeira Vaz da Silva

Orientadores

Professora Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública/Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa/

LAQV-REQUIMTE/ Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professora Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública/Maria do Céu Ribeiro Lamas/ LAQV-

REQUIMTE/ Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.



Agradecimentos

A concretização deste relatório de estágio não seria possível sem o apoio e colaboração de diversas pessoas e instituições.

Antes de mais, agradecer às minhas orientadoras, as Sras. Professoras Maria Manuela Amorim e Maria do Céu Lamas, que me guiaram desde o início deste percurso e me permitiram concluir o mesmo com sucesso.

Agradecer também ao grupo Silliker Portugal S.A. por me ter integrado na instituição e um especial agradecimento à Dra. Patrícia Costa – Responsável do Laboratório de Microbiologia – pela oportunidade de me ter aceiteado enquanto estagiária e por todas as orientações dadas. Um enorme obrigada, a todos os técnicos do laboratório que tanto me ensinaram, tanta paciência tiveram e tão bem me acolheram.

Gostaria também de expressar a minha gratidão ao meu local de trabalho pela oportunidade única que me deu de conciliar tudo isto, e agradecer às minhas colegas de trabalho pelo apoio durante todo este percurso.

Por último, mas não menos importante, um especial obrigada aos meus pilares – a minha família e o meu namorado – que tanto me apoiaram, tanta força e motivação me deram quando mais precisei. Sem vocês nada disto seria possível.

A todos vós, o meu profundo obrigada!



Resumo

O presente relatório encontra-se dividido em dois capítulos: Capítulo 1 que descreve o estágio no Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal – Biomérieux Nutrisciences; Capítulo 2 que apresenta como caso de estudo a validação de um método de Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó.

No Capítulo 1 são descritas as metodologias observadas e executadas durante o estágio, permitindo a consolidação e aprendizagem de conhecimentos teóricos e práticos, relacionados com a preparação de meios de cultura, realização de análises microbiológicas de alimentos e águas e todas as boas práticas laboratoriais.

No Capítulo 2 há o foco na validação do método laboratorial Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó, que quando presentes representam um grande desafio para a qualidade e segurança dos produtos láteos. O método inclui tratamento térmico apropriado bem como meio de cultura específico. Os resultados demonstraram consistência com dados de referência, evidenciando capacidade de deteção fiável e reprodutível, como boa sensibilidade ou eficiência, garantindo a adequação e eficácia do método.

Entende-se que este método contribui para reforçar o controlo microbiológico na indústria láctea e que apoia em práticas laboratoriais mais seguras, cumprindo requisitos de qualidade e segurança alimentar.

Palavras-chave: esporos aeróbios termófilos; *G. stearothermophilus*; leite em pó; método; validação



Abstract

This report is divided into two chapters: Chapter 1 describes the internship carried out at the Microbiology Laboratory of Silliker Portugal – Biomérieux Nutrisciences; Chapter 2 presents, as a case study, the validation of a method for the enumeration of Thermophilic Aerobic Spores at 55 °C in powdered milk.

Chapter 1 details the methodologies observed and performed during the internship, enabling the consolidation and acquisition of theoretical and practical knowledge related to the preparation of culture media, the execution of microbiological analyses of food and water, and the application of laboratory best practices.

Chapter 2 focuses on the validation of the enumeration method for thermophilic aerobic spores at 55 °C in powdered milk, microorganisms that represent a major challenge to the quality and safety of dairy products. The method included appropriate heat treatment as well as the use of a specific culture medium. The results were consistent with reference data, demonstrating reliable and reproducible detection capacity, with good sensitivity and efficiency, thereby confirming the adequacy and effectiveness of the method.

It is concluded that this method contributes to strengthening microbiological control in the dairy industry, supporting safer laboratory practices and compliance with quality and food safety requirements.

Keywords: *G.stearohermophilus*; method; powdered milk; thermophilic aerobic spores; validation



Índice

Capítulo I – Estágio no laboratório Silliker – Biomérieux Nutrisciences.....	1
1. Contextualização do estágio	1
1.1. Objetivos.....	1
1.2. Caracterização da instituição de Estágio.....	1
1.3. Laboratório de Microbiologia.....	2
1.3.1. Organização do Laboratório de Microbiologia.....	3
1.3.2. Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia	3
1.3.2.1. Sala de Preparação dos Meios	4
1.3.2.2. Procedimentos relativos às análises microbiológicas	5
1.3.2.2.1. Pesagem de amostras – Pós (Sala Principal do Laboratório).....	6
1.3.2.2.2. Bancada das diluições (Sala Principal do Laboratório).....	7
1.3.2.2.3. Zaragatoas.....	8
1.3.2.2.4. Bebidas	10
1.3.2.2.5. Bancada de distribuição de meios de cultura (Sala Principal do Laboratório).....	11
1.3.3. Análise das Águas.....	15
1.3.3.1. Preparação e Processo de Filtração de Águas	16
Capítulo II – Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó.....	20
1. Introdução.....	20
1.1. Leite em Pó: Propriedades e Riscos.....	20
1.2. Fatores promotores da esporulação bacteriana	21
1.3. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> : agente de referência.....	24
1.4. Procedimentos de Verificação e Critérios de Validação de Métodos Microbiológicos	24
1.5. Objetivos.....	25
1.6. Metodologia.....	25
1.6.1. Instrumentos e procedimentos.....	25
1.6.2. Materiais e reagentes.....	27
1.6.3. Preparação do Meio de Cultura Dextrose Tryptona Agar	28
1.6.4. Preparação das amostras de leite em pó para análise	28
1.6.5. Procedimento Experimental.....	29
2. Tratamento e análise de dados.....	33



2.1. Questões éticas.....	34
3. Resultados.....	35
3.1. Características de desempenho.....	35
3.1.1. Estudo da Precisão.....	39
3.1.2. Estudo da Sensibilidade e Especificidade	41
3.1.3. Taxa de Falsos Positivos e Negativos	41
3.1.4. Seletividade e Eficiência	41
3.1.5. Estudo da Incerteza	43
4. Discussão.....	45
5. Conclusão.....	49
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	51
Anexo 3.....	55
Anexo 4.....	56
Referências Bibliográficas.....	57



Índice de Figuras

Figura 1 – Parte da bancada principal Sala de Preparação dos Meios.....	5
Figura 2 – Parte da bancada principal Sala de Preparação dos Meios.....	5
Figura 3 – Parte da bancada da Sala Principal do Laboratório.....	7
Figura 4 – Exemplo do método de incorporação recorrendo a diluições decimais Suporte de zaragatoas para análise devidamente identificadas.....	8
Figura 5 – Suporte de zaragatoas para análise devidamente identificadas.....	9
Figura 6 – Bancada de distribuição dos meios de cultura (Sala Principal do Laboratório).....	11
Figura 7 – Exemplo de fluxograma do procedimento de análise de Bolores e Leveduras Cultura em placa de colónias típicas de bolores e leveduras em meio Symphony agar.....	12
Figura 8 – Cultura em placa de colónias típicas de bolores e leveduras em meio Symphony agar.....	12
Figura 9 – Rampa de filtração por membrana.....	18
Figura 10 – Esquema representativo de filtração por membrana.....	18
Figura 11 – Exemplo de fluxograma para análise de enterococos fecais.....	19
Figura 12 – Representação esquemática de processos favoráveis à formação de esporos segundo fatores ambientais.....	22
Figura 13 – Esporos de <i>G. stearothermophilus</i> (ATCC7953) sob microscopia de contraste de fase (100x).....	24
Figura 14 – Ensaio em branco.....	30
Figura 15 – Controlo positivo – inoculação do meio DTA com a estirpe de <i>G. stearothermophilus</i> que desenvolveu as colónias típicas expectáveis.....	30
Figura 16 – Tentativas de diluição correta para permitir contagem das colónias.....	30
Figura 17 – Exemplo de colónias em excesso impossibilitando contagem, mesmo usando contador automático.....	31
Figura 18 – Exemplo de colónias típicas desejáveis para contagem em placa.....	38
Figura 19 – Resultados de uma mesma amostra de leite em pó contaminada com <i>G. stearothermophilus</i> , a quadruplicar, evidenciando as colónias expectáveis.....	38
Figura 20 – Colónias de <i>G. stearothermophilus</i> em meio DTA resultantes de amostra de leite em pó contaminada.....	39
Figura 21 – Representação gráfica da Carta de Duplicados de amostras analisadas de leite em pó para contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C.....	41



Figura 22 – Colónias de esporos aeróbios termófilos isolados de material de cama de vacas leiteiras, cultivadas em DTA após incubação a 55°C por 48h.....	48
Figura 23 – Tabela de resultados de análises em duplicado de amostras de leite em pó, para gerar carta de duplicados permitindo o cálculo do desvio-padrão, ou seja, gerar o cálculo de precisão.....	55
Figura 24 – Tabela com compilação de amostras realizadas em paralelo, permitindo o cálculo da incerteza do método.....	56

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Organização do laboratório de microbiologia	3
Tabela 2 – Microrganismo-alvo: suas definições e características de análise	13
Tabela 3 – Etapas tratamento térmico e ácido de águas da matriz 1.....	15
Tabela 4 – Etapas prévias e preparação de filtração por membrana de águas	17
Tabela 5 – Características necessárias para validação de métodos de género alimentício	26
Tabela 6 – Parâmetros usados na avaliação do desempenho e concordância entre metodologias.....	33
Tabela 7 – Exemplo de uma amostra e respetivos registos necessários para a compilação de contagens de esporos aeróbios termófilos a 55°C em amostras de leite em pó	35
Tabela 8 – Resumo das amostras analisadas para a contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C no leite em pó.....	36
Tabela 9 – Valores de duplicados e logaritmos correspondentes. Desvio-padrão e suas amplitudes. Cálculo do critério de precisão	39
Tabela 10 – Resultados presuntivos e confirmatórios para avaliação da sensibilidade e especificidade do método.....	41
Tabela 11 – Resultado dos parâmetros que caracterizam o desempenho do método, estimativa pontual e intervalo de confiança de cada um deles.....	42
Tabela 12 – Resultados das amostras executadas em paralelo, usadas para o cálculo da incerteza de medição.....	44
Tabela 13 – Compilação dos resultados da análise de amostras de leite em pó para o método de contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C	51



Lista de Abreviaturas

ALOA – Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti

BCYE – Buffered Charcoal Yeast Extract Agar

BGPP – Brilliant Green Phenol Red Agar Base with Pyruvate

BPW – Buffered Peptone Water

CCA – Chromogenic Coliform Agar

DTA – Dextrose Tryptone Agar

E. coli – *Escherichia coli*

ESG – Environmental, Social and Governance

ETAR – Estações de Tratamento de Águas Residuais

FQ – Físico Químico

GC. Broth – Gonococcus Broth

G. stearothermophilus – *Geobacillus stearothermophilus*

GVPC – Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide Agar

IQ – Installation Qualification

KF – Kalium Ferricyanide

LAURIL – Lauril Sulfato de Sódio

MIA – Métodos Instrumentais de Análise

MRD – Maximum Recovery Diluent

MYP – Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar

NaOH – Hidróxido de Sódio

PAM – Procedimentos relativos à análise microbiológica

PCA – Plate Count Agar



SLANETZ – Slanetz and Bartley Agar

TBX – Tryptone Bile X–glucuronide Agar

TSC – Tryptose Sulfite Cycloserine Agar

TSA – Tryptic Soy Agar

VM – Validação de Métodos

VRB – Violet Red Bile Agar

VRBG – Violet Red Bile Glucose Agar



Organização do Relatório de Estágio

O presente relatório foi elaborado no âmbito da unidade curricular Estágio, para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública, na área de especialização em Microbiologia e Saúde Pública, na Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto (ESS|P.Porto).

Este relatório está organizado em dois capítulos:

Capítulo I – Relatório de Estágio, no qual são descritas as atividades desenvolvidas durante o estágio na Silliker Portugal S.A. – Biomérieux Nutrisciences

Capítulo II – Estudo de caso, denominado por “Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó”. Neste capítulo encontra-se descrito todo o processo de validação do método e resultados associados.



Capítulo I – Estágio no laboratório Silliker – Biomérieux Nutrisciences

1. Contextualização do estágio

No âmbito da Unidade Curricular “Estágio” do Mestrado de Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo em Microbiologia e Saúde Pública, foi realizado o estágio curricular na área da Microbiologia Alimentar e Saúde Pública no Laboratório Silliker Portugal, S.A. – Biomérieux Nutrisciences. O estágio decorreu no período de outubro de 2024 a maio de 2025, com a duração de 615 horas, distribuídas em atividades laboratoriais práticas e momentos de integração institucional, culminando na elaboração do presente relatório de estágio e respetivo projeto aplicado.

1.1. Objetivos

O estágio curricular teve como principais objetivos consolidar conhecimentos em Análise Clínicas com especial foco em Microbiologia e Saúde Pública, adquirir novos conhecimentos e competências, compreender as rotinas laboratoriais, bem como as diferentes metodologias utilizadas no dia-a-dia de um laboratório de microbiologia alimentar.

1.2. Caracterização da instituição de Estágio

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa sediada em Vila Nova de Gaia e foi fundada em 1992 sob a designação inicial EGI, de prestação de serviços ligados ao setor agroalimentar. Desde 2014 passou a integrar o grupo internacional Mérieux Nutrisciences, um dos maiores grupos mundiais dedicados à prestação de serviços na área da segurança e qualidade alimentar, com mais de 50 anos de experiência científica e empresarial.

Atualmente, a empresa presta serviços especializados a diferentes setores, incluindo indústria alimentar, embalagens, água e ambiente, produtos de consumo, dispositivos médicos, cosmética e cuidados pessoais, e produtos agroquímicos, garantindo suporte científico aos seus clientes.(1)

O edifício da Silliker está dividido em vários setores, sendo os principais o Laboratório de Microbiologia, onde realizei o estágio, e o Laboratório de Química subdividido em FQ e MIA. Para além destes laboratórios, tive também a oportunidade de conhecer



outros departamentos, sendo que alguns destes se localizam noutro edifício na mesma localidade:

- Departamento Comercial
- Departamento de Ambiente ESG
- Departamento de Análise Sensorial, Inovação e Tecnologia
- Departamento de Assessoria
- Departamento de Bens de Consumo, Cosméticos, Pharma e Departamento de Materiais de Contacto Alimentar
- Departamento de Gestão de Amostras
- Departamento de Marketing
- Departamento de Operações
- Departamento de Preparação de amostras e Subcontratos
- Departamento de Rotulagem e Legislação
- Departamento de Tecnologias de Informação e Proteção de Dados
- Departamento de Serviço ao Cliente(2)

1.3. Laboratório de Microbiologia

O Laboratório de Microbiologia tem como principal função a análise microbiológica de alimentos, contudo, encontra-se também envolvido na análise microbiológica de águas, cosméticos e ensaios higiossanitários (zaragatoas). Estas análises são fundamentais para garantir a segurança e a qualidade dos produtos e dos ambientes de produção, podendo ser feitas através de métodos em cultura ou métodos rápidos, em função do tipo de produto e da necessidade do cliente. Os microrganismos mais possíveis de causar contaminações e por consequência os mais analisados são as bactérias e as suas toxinas. Assim sendo, o laboratório garante que os alimentos se encontram livres dos seguintes agentes patogénicos através da análise dos mesmos:

- *Listeria monocytogenes*
- *Escherichia coli*
- Enterotoxinas
- *Campylobacter*
- *Vibrio* spp.
- *Staphylococcus coagulase positiva*
- *Bacillus cereus*
- *Legionella pneumophila*
- *Salmonella*
- *Cronobacter* spp.(3)



1.3.1. Organização do Laboratório de Microbiologia

O Laboratório de Microbiologia encontra-se organizado em diversos espaços conforme representado na Tabela 1. Esta orientação permite garantir que as amostras fazem um trajeto unidirecional ou também conhecido “marcha em frente”, não havendo cruzamentos e contacto entre material limpo e contaminado.(4)

Tabela 1 - Organização do laboratório de microbiologia (4)

Espaços do Laboratório	Funções principais	Observações
Batching (Sala dos Lotes)	Receção e organização de amostras diárias	Processamento inicial diário
Sala de Preparação dos Meios	Preparação e armazenamento de meios de cultura	Equipamentos específicos como autoclaves e placas de aquecimento
Sala Principal	Processamento geral de amostras, de todo o tipo de matrizes (cruas ou processadas), onde se realizam diversas tarefas como pesagem, suspensões, diluições, distribuição de meios de cultura, esterilidades e medições de pH	Possui diferentes bancadas, cada uma delas específica para cada tipo de procedimento (por exemplo, bancada dos pós, bancada de diluições dos processados, bancada de distribuição de meios, entre outras)
Sala da Cosmética	Análise de produtos cosméticos	Menor número de amostras
Sala para Análise das águas	Filtração e análise de águas e afins	Inclui análise de <i>Legionella</i>
Sala dos Quantitativos	Incubação, leitura de resultados e confirmações	Localização das estufas para incubação
Sala dos Patogénicos	Análise e incubação de patogénicos	Espaço mais isolado com equipamentos específicos como microscópio, densitómetro, estirpes bacterianas, entre outros
Sala de Descontaminação e Lavagem	Tratamento de material contaminado	Localizada na parte exterior ao laboratório

1.3.2. Atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia

Durante o estágio, participei em diversas tarefas da rotina laboratorial em Microbiologia. Estas incluíram apoio na Sala dos Meios de Cultura, na Bancada das contagens/diluições, na Bancada de distribuição de meios de cultura e na Sala de análise das águas, colaborando sempre de acordo com as necessidades de cada dia.



1.3.2.1. Sala de Preparação dos Meios

Foi neste local que desempenhei a maioria das tarefas nos primeiros meses, na medida que é aqui que são produzidos diariamente inúmeros meios de cultura ao longo do dia, incluindo alguns utilizados nas minhas amostras e cuja preparação apoiei. Participei igualmente, com recurso a autoclaves, na esterilização de materiais de uso corrente em laboratório (frascos, talheres, mangueiras de distribuição de meios, entre outros), cruciais para diversas tarefas.

Aqui é também realizado o controlo de qualidade dos meios de cultura, identificação e armazenamento dos mesmos, sejam preparados internamente ou já prontos a uso e/ou por adicionar suplementos e diluentes. De referir ainda, a preparação dos volumes de diluentes necessários para as análises microbiológicas.

Os meios de cultura são pesados e misturados com o respetivo diluente, conforme as necessidades face às amostras previstas semanalmente. Alguns exemplos dos mais frequentemente produzidos/preparados: PCA, VRB, VRBG, MRD, KF, BPW, TBX, SLANETZ, TSA, MYP ou BGBB (Brilliant Green Bile Broth). Alguns meios, como o VRBG E VRB, são pesados e preparados diretamente com água estéril/peptonada tamponada e vão diretamente para a placa a ferver prontos a serem usados, enquanto outros como o BPW e o PCA, são preparados com água desionizada e submetidos a autoclavagem, a maioria deles a 121°C durante 15 minutos, só podendo ser usados posteriormente. Outros meios já se encontram prontos, sejam eles líquidos ou sólidos, como o ALOA, Half-Fraser ou o Rapid'Salmonella que se encontram armazenados nos frigoríficos.

Alguns meios são preparados em frascos de diferentes volumes (2L, 1L ou 500 mL, por exemplo) enquanto outros vão diretamente para autoclavagem em tubos como o MRD. Os frascos são numerados de forma sequencial e semanal, sempre que é preparado mais de um frasco por dia de determinado meio. Esta numeração não é aplicável no caso dos diluentes. Os ingredientes/pó do meio desidratado são assim adicionados ao volume de água e deve ser evitada a formação de "caroços", sendo importante uma boa agitação manual e contínua e depois, aquecer caso seja necessário, até dissolução total antes da esterilização.

Cada meio de cultura tem o seu próprio registo associado onde constam informações relativas à marca, referência interna e do fornecedor, bem como o pH, estirpes utilizadas nos controlos positivo e negativo, massas e volumes mais utilizados, validade e o



seu local de armazenamento após preparação. Estes registos, efetuados em documento Excel designado IQ.40 servem para fins de controlo de qualidade, por isso, para cada pesagem é feito o seu registo. Os meios que não são usados de imediato, após preparação e esterilização, são armazenados a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ devidamente identificados e com data de validade, com exceção da água peptonada tamponada e a triptonal sal (MRD) que devem ser guardados no escuro e à temperatura ambiente.

Os meios refrigerados podem ser reaquecidos uma única vez, por banho-maria ou micro-ondas a determinadas temperaturas e tempos, até estarem homogeneamente liquefeitos, de modo a poderem ser novamente utilizados.

Quando se associa os meios às amostras, é importante que sempre que possível se agrupe um lote de amostras aos lotes de meio utilizados e registar os mesmos, e que para cada amostra, em cada ensaio, esteja inserida a data de validade ou o lote do meio utilizado, o número do frasco, ciclo de autoclavagem e respetiva autoclave do meio a usar.(5) Nas Figura 1 e 2 está representada uma vista geral da Sala de Preparação dos Meios.



Figuras 1 e 2 – Parte da bancada principal Sala de Preparação dos Meios

1.3.2.2. Procedimentos relativos às análises microbiológicas

Antes de iniciar qualquer procedimento nesta bancada, é fundamental garantir que a preparação das amostras que são admitidas diariamente ao laboratório de Microbiologia, segue rigorosos critérios de qualidade e segurança:

- Integridade da amostra: cada amostra recebida deve estar intacta, protegida de possíveis contaminações externas e em quantidade suficiente para a realização dos ensaios;
- Condições do recipiente: verificar as condições do recipiente da amostra, nomeadamente se apresenta algum dano ou fuga e verificar características como o



cheiro, a cor, se há sinais de produção de gás, entre outros aspetos que possam representar degradação da amostra.

- Prazo para análise: no caso de produtos perecíveis (ex. zaragatoas ou marisco), a preparação das amostras deve ser iniciada até um máximo de 24 horas após a colheita das mesmas enquanto para peixe ou leite cru há o limite de 36 horas.
- Separação entre matrizes: desde a receção até à análise, as amostras processadas e cruas devem permanecer o mais afastadas possível, prevenindo contaminações cruzadas.(6)

1.3.2.2.1. Pesagem de amostras – Pós (Sala Principal do Laboratório)

Como o meu caso de estudo envolvia amostras de leite em pó, tive a oportunidade de pesar várias amostras deste tipo, como farinhas, leites em pó, leveduras, entre outras.

A pesagem deste tipo de amostras exige precisão: tolerância permitida de 5%, com um mínimo de 10 mL ou 1 g, acondicionados em sacos com filtro. Para produtos secos ou em pó, a preparação deve ser feita em área separada das demais amostras (câmara de pós) ou, se necessário, no fim da preparação das outras amostras. É fundamental utilizar, um sistema de exaustão/ventilação próximo à câmara da balança analítica para criar um ambiente controlado e que auxilie na estabilização da pesagem.(6)

Antes da recolha de qualquer amostra, alguns cuidados são essenciais, nomeadamente:

- Limpeza e desinfecção: antes de iniciar qualquer pesagem, é muito importante limpar e desinfetar todas as superfícies e balanças, bem como desinfetar a bancada de trabalho antes e entre amostras diferentes e de clientes diferentes, de forma a garantir que todas as fontes de contaminação são eliminadas ou pelo menos, reduzidas ao mínimo.
- Preparação das embalagens: as embalagens devem também ser limpas e desinfetadas antes de abrir sempre que o exterior o permita. Limpar com o desinfetante em uso em laboratório, secar com papel, desinfetar com álcool a 70% e de seguida abrir a embalagem com material esterilizado e de forma que permita retirar a quantidade de amostra suficiente.
- Utensílios estéreis: na preparação das amostras, quer em pós quer noutras matrizes, todos os utensílios devem ser estéreis e uma vez utilizados não devem ser colocados na bancada de trabalho ou bandeja, mas sim num recipiente apropriado.



- Manuseamento dos pós: devem ser preparados de forma a minimizar a sua dispersão pelo laboratório e ao misturar a amostra com o seu diluente (BPW de concentração dupla, por exemplo), segue para 1 minuto no *stomacher*. Quando em quantidades maiores de amostra, a suspensão-mãe pode ser feita em frascos e bem fechado deve ser agitado e invertido.(6)

1.3.2.2. Bancada das diluições (Sala Principal do Laboratório)

Este setor, é onde se concentra o maior volume de trabalho e constitui o ponto central das análises microbiológicas, pois é aqui que se realizam as diluições das amostras na suspensão-mãe, ou seja, após as mesmas terem sido previamente preparadas com o seu diluente respetivo na zona de preparação de amostras. É necessário garantir que entre a preparação da suspensão inicial e o momento em que o inóculo contacta com o meio de cultura, o tempo não ultrapasse os 45 minutos. (4)

Neste espaço, são seguidos os procedimentos internos do laboratório para cada parâmetro/microrganismo e respetivas diluições. Este setor exige grande responsabilidade, pois daqui seguirão as sementeiras em placa de cada amostra, que posteriormente terão incorporação do meio de cultura, e no final de todas as etapas, determinarão os resultados a disponibilizar aos clientes. Devido ao rigor exigido, apenas foi possível executar tarefas mais simples, como por exemplo, diluições para zaragatoas e bebidas e a identificação de placas por amostra e parâmetro.

De um lado da bancada são feitas as análises microbiológicas para os alimentos crus, como carnes, enchidos ou mariscos, e zaragatoas, sendo que do outro lado (Figura 3) são feitas as análises para alimentos processados, como por exemplo bolos, comidas pré-confecionadas, doces, entre muitos outros e também líquidos, como sumos ou iogurtes. A diversidade de amostras alimentares é enorme e há de tudo um pouco, havendo variadas marcas, formatos e matrizes.



Figura 3 - Parte da bancada da Sala Principal do Laboratório



As metodologias são definidas por parâmetros, mas são muito similares, consistindo na maioria a transferência de 1 mL da suspensão-mãe para placa de Petri (previamente identificada com o número de amostra e meio de cultura correspondente). Nos casos que requerem diluições sucessivas, é transferido 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de 9 ml de diluente estéril à temperatura ambiente (por exemplo, MRD). Durante estas diluições, o contacto da pipeta com inóculo entre o diluente estéril deve ser evitado para que não haja contaminação cruzada e deve ser usada uma placa por diluição em pelo menos duas diluições sucessivas. Entre diluições deve-se usar o vórtex durante 5 a 10 segundos. Ao retirar o volume necessário do tubo, a ponta da pipeta deve ser encostada à parede do tubo para remover o excesso de líquido que tenha aderido ao exterior e a placa de Petri na qual se vai dispensar o conteúdo da pipeta, deve ser levantada apenas à altura necessária para tal. Faz-se assim, sementeira por incorporação em placa, representada pela Figura 4.(4,6)

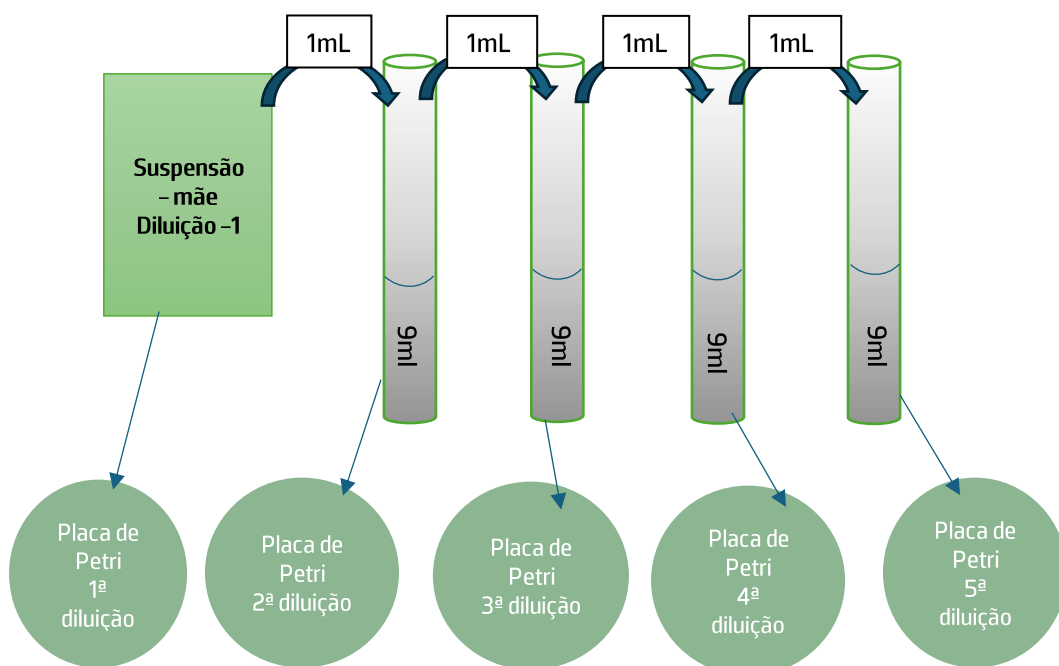


Figura 4 - Exemplo do método de incorporação recorrendo a diluições decimais

1.3.2.2.3. Zaragatoas

Para além das amostras alimentares, existem também amostras de origem ambiental, como é o caso das zaragatoas, que foram processadas variadas vezes.



Quando chegam ao laboratório, as zaragoas são imediatamente identificadas e etiquetadas. Cada tubo pode corresponder a zaragoas e a utensílios, como tábuas de cortes ou talheres, bem como a superfícies, bancadas ou mãos, entre outros.

Alguns tubos de determinadas amostras possuem mais do que uma etiqueta, com a designação dos meios Half-Fraser ou BPW. Nestes casos, o tubo após as diluições não será logo descartado, mas guardado no frigorífico para logo que possível seguir para as pesquisas (método qualitativo), que terão o respetivo diluente conforme indicado na etiqueta.

Após a identificação de cada tubo, as etiquetas remanescentes indicam os parâmetros a analisar e as diluições necessárias, exemplificado na Figura 5. Com base nestas informações, preparam-se as placas de Petri, sendo uma diluição por placa. Na placa da primeira diluição escreve-se o tipo de microrganismo ou o meio a usar, conforme o indicado na etiqueta para que quando seguir para a bancada de distribuição de meios seja rápido e fácil de distinguir e fazer a respetiva incorporação.

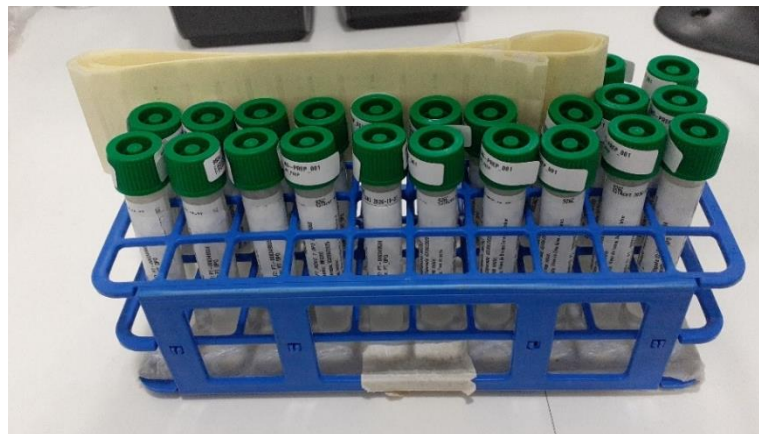


Figura 5 - Suporte de zaragoas para análise devidamente identificadas

Depois deste processo de identificação e diferenciação, cada tubo contendo a zaragoa, é agitado no vórtex por cerca de 60 segundos. Após desinfecção, procede-se à análise pipetando do tubo 1ml para a placa de Petri correspondente, e caso seja necessário, efetuam-se diluições decimais conforme indicado no procedimento da Figura 4, fazendo-se assim sementeira em placa.(6)

Alguns microrganismos requerem metodologias específicas. Por exemplo, para esporos: 1 mL da zaragoa é diretamente incorporado num tubo do meio GC-Broth previamente fundido, adicionado com 0,1 mL de suplemento e por fim 1 mL de agar, seguindo depois para incubação após solidificação.



1.3.2.2.4. Bebidas

Entre as amostras analisadas, realizou-se análises a várias bebidas, incluindo sumos, leites, adoçantes, cervejas, águas com gás ou vinhos.

No caso de bebidas gaseificadas, é dispensada uma pequena quantidade para um pequeno recipiente para que o gás seja libertado manualmente e possibilite uma pipetagem adequada por evitar a espuma produzida por estas bebidas. Todos os cuidados de desinfeção e manipulação da amostra devem ser mantidos.(6)

A análise deste tipo de amostras é semelhante à utilizada para as zaragoas, conforme o tipo de parâmetro exigido. No entanto, dois parâmetros em particular exigem procedimentos distintos:

- *Bacillus cereus*: pipeta-se 1 mL (para detetar contagens mais baixas) da suspensão-mãe, incorporando diretamente em meio sólido MYP, distribuído em 3 placas de Petri. O espalhamento é realizado com um espalhador o mais rápido possível e sem tocar nas paredes da placa, de modo a permitir que o inóculo seja absorvido 15 minutos à temperatura ambiente (sementeira em placa com meio já distribuído). Caso seja necessário, repetir este passo para diluições seguintes.

O meio MYP é produzido na Sala de Preparação dos Meios, mas quando é destinado à distribuição em placa para posterior utilização, a cada frasco de 500 mL é acrescentado um suplemento previamente hidratado com 1 mL de água estéril e adicionado 50 mL de gema de ovo bem homogeneizada.

- Esporos: pipeta-se cerca de 4 mL para um tubo, sujeito a choque térmico a 80°C durante 13 minutos ou a 64°C durante 30 minutos. Após serem arrefecidos em água fria, procede-se à pipetagem de 1 mL e respetivas diluições, para as placas de Petri (sementeira em placa) para posteriormente seguirem para incorporação com o meio de cultura adequado.

Após estes procedimentos, as sementeiras seguem para a bancada de distribuição de meios de cultura, em articulação com a Sala de Preparação dos Meios, garantindo o controlo e continuidade em todo o processo.



1.3.2.2.5. Bancada de distribuição de meios de cultura (Sala Principal do Laboratório)

No início de cada sessão de trabalho, o responsável por esta bancada assegura a preparação dos meios de cultura previamente preparados, a fundir, conforme as necessidades mais habituais de acordo com o tipo e volume de amostras que vão chegando, e gerindo quais as quantidades ao longo do dia de meios que devem ser colocados a fundir para se utilizarem. Após isto, os meios de cultura são mantidos a 44 - 47°C no banho até a sua utilização e devem ser mantidos liquefeitos num prazo máximo de 4 horas.

Nesta área, as placas de cada diluição são organizadas segundo o parâmetro ou meio de cultura, para que a incorporação seja mais fácil e rápida e se evite retirar do banho vários meios de cultura em simultâneo.

Ao retirar os meios de cultura do banho para se adicionar às placas com inóculo, é importante passar o frasco por um papel seco e limpo e desinfetar o mesmo, de modo que a água do banho não contamine as placas. É essencial evitar derrames, no exterior do frasco ou ao redor da placa aquando da inoculação.

Ao verter o meio na placa de Petri, a mistura com o inóculo deve ser feita com precaução, evitando colocar o meio diretamente sobre o inóculo, garantindo uma distribuição homogénea dos microrganismos em toda a superfície da placa (cerca de 15 a 20 mL de meio por placa). (4)

Assim que o meio solidifica na bancada apropriada (Figura 6), as placas, na maioria dos casos, são invertidas e vão a incubar nas estufas à temperatura adequada para cada microrganismo. Cada placa ou recipiente é devidamente etiquetado com a temperatura e tempo de incubação, bem como as datas de início e de leitura/validação de resultados. As diluições entre amostra devem ser mantidas para permitir uma leitura de resultados mais rápida e fiável.



Figura 6 - Bancada de distribuição dos meios de cultura (Sala Principal do Laboratório)



Apresenta-se abaixo um exemplo de fluxograma referente a um dos microrganismos analisados no laboratório e no qual existiu a oportunidade de colaborar e observar os resultados (Figura 7 e 8). A análise de cada microrganismo é documentada através deste tipo de fluxogramas podendo variar ligeiramente em alguns passos conforme o agente etiológico em estudo. Estes fluxogramas, que descrevem o procedimento interno para cada microrganismo, encontram-se arquivados em formato digital, garantindo o acesso imediato a todos os analistas sempre que necessário.

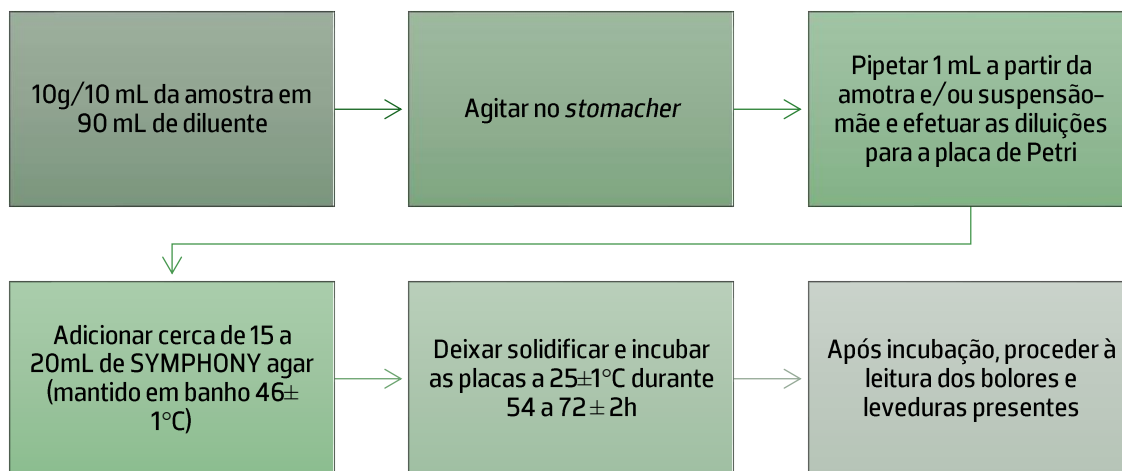


Figura 7 - Exemplo de fluxograma do procedimento de análise de Bolores e Leveduras

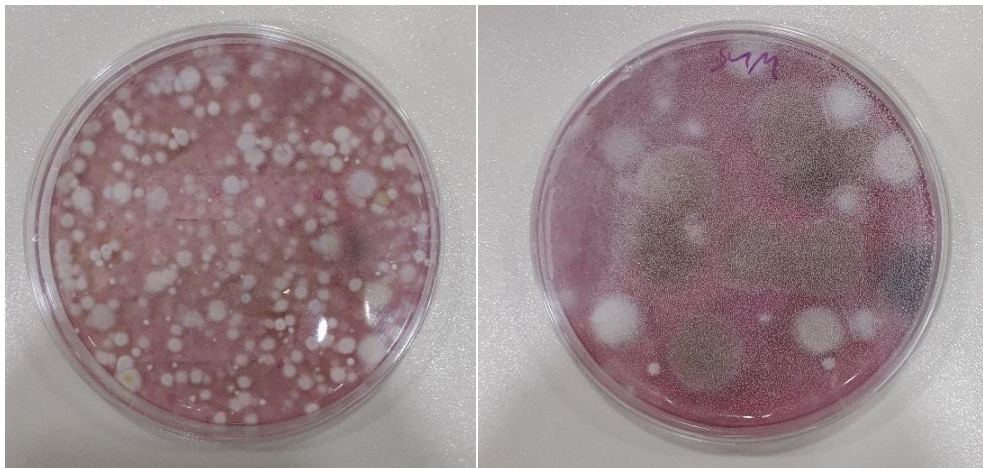


Figura 8 - Cultura em placa de colónias típicas de bolores e leveduras em meio Symphony agar

De forma a ser mais simples representar os vários microrganismos de análise ao longo do estágio, a tabela seguinte (Tabela 2) mostra de forma sucinta os principais pontos sobre cada um deles.



Tabela 2 – Microrganismo-alvo: suas definições e características de análise (7) (Continuação página seguinte)

Microrganismo-alvo	Definição	Características de inoculação e incubação
Microrganismos a 30°C	Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos presentes numa amostra. Inclui grande diversidade de bactérias. Indicador de qualidade de higiene, processamento e armazenamento de alimentos	Sementeira por incorporação em placa de meio PCA; incubação a 30±1 °C durante 72±3 h
<i>Enterobacteriaceae</i>	Família de bactérias Gram-negativas, fermentadoras de glicose. Inclui patogénicos e indicadores de higiene.	Sementeira por incorporação em placa de meio VRBG; Camada dupla; incubação a 37±1°C durante 24±2h
Coliformes	Frequentemente utilizado pela indústria de laticínios como indicador de higiene. Gram-negativas, fermentadoras de lactose com produção de gás a 30°C.	Sementeira por incorporação em placa de meio VRB; Camada dupla; incubação a 30±1°C por 24±2 h
Coliformes Termotolerantes	Pertencem ao grupo dos coliformes, mas são capazes de crescer a partir de 44 °C. Alguns são de origem fecal.	Sementeira por incorporação em placa de meio VRB ou TBX; incubação a 44 ±0,5°C por 24±2h
<i>Listeria spp.</i>	Gram-positiva, forma de bacilos curtos, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos; torna-se imóvel a 37°C. Encontrado em ampla variedade de habitats.	Sementeira por incorporação em placa de meio ALOA agar; incubação a 37 ±1°C por 24–48h
<i>Escherichia Coli</i>	Gram-negativa. Tem origem no trato intestinal de animais e humanos. Marcador de contaminação fecal por exemplo na produção de alimentos. Algumas estirpes são patogénicas.	Sementeira por incorporação em placa de meio TBX agar; incubação a 44±0,5°C durante 24±2h
Bolores e Leveduras	Desempenham importante papel na deterioração de alimentos. Fungos filamentosos e unicelulares com facilidade de crescimento em vários meios.	Sementeira em placa por incorporação em meio Symphony agar; incubação a 25±1°C de 54 a 72±2h; placas não invertidas e seladas com saco.
<i>Bacillus cereus</i>	Uma das principais espécies envolvidas em intoxicações alimentares. O grupo <i>Bacillus</i> é amplamente encontrado em poeiras e solos e inclui muitas espécies Gram-positivas	Sementeira à superfície em meio sólido MYP; incubação a 30±1°C durante 48±1h em placas não invertidas.



Microrganismo-alvo	Definição	Características de inoculação e incubação
	formadoras de esporos, que resistem a processos térmicos, mas só em grande número provocam doença.	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivos e anaeróbios facultativos. Causa comum de infeções cutâneas em humanos, daí a facilidade em se introduzir em alimentos.	Sementeira à superfície em placa em meio Baird-Parker; incubação a 37±1°C por 24–48 h
<i>Clostridium perfringes</i>	Muito presente em fezes de animais e humanas, bem como em vegetação, solos, pós e insetos. É Gram-positiva, anaeróbio, não possui mobilidade e forma esporos. Muito comum como contaminante em carnes e aves e provoca diarreias e dores abdominais como consequência da sua presença em alimentos.	Sementeira por incorporação, em meio TSC; placas incubadas em jarra de anaerobiose a 37±1°C durante 24±1h
Esporos anaeróbios mesófilos (BREWER)	Esporos de bactérias mesófilas anaeróbias, resistentes. Associadas a deteriorações alimentares.	Tratamento térmico (80°C/10 min) seguido de sementeira em meio Brewer; incubação em jarra de anaerobiose a 30±1°C durante 48h.
Esporos aeróbios a 30°C (PCA)	Esporos de bactérias mesófilas aeróbias presentes em alimentos e ambiente. Indicador de resistência térmica.	Tratamento térmico (80°C/10 min) seguido de sementeira em PCA; incubação a 30 ±1°C por 48h.
<i>Campylobacter</i> spp.	São microaerófilas, gram-negativas e de mobilidade rápida. Podem infetar humanos com contacto direto em humanos ou indiretamente em água, carne ou leite que estejam contaminados. Muitas das amostras a examinar já receberam algum tipo de aquecimento, refrigeração ou congelamento.	Sementeira à superfície em placa de meio sólido CFA; incubação a 41,5±2°C durante 44±4h
Bactérias Lácticas (<i>Lactobacillus</i>)	Grupo de bactérias Gram-positivo que produzem elevadas quantidades de ácido láctico. Papel importante de deterioração de carne e alimentos embalados a vácuo. Algumas estirpes são usadas na fabricação de alimentos fermentados como queijo e iogurtes.	Sementeira por incorporação em placa com meio MRS; incubação a 30± 1°C durante 72±3h



1.3.3. Análise das Águas

Um dos espaços laboratoriais que mais entusiasvou conhecer e apoiar foi a Sala para Análise das Águas.

Quase diariamente existem amostras de águas para análise, embora o volume de amostras varie consideravelmente. Nesta sala realizam-se contagens de microrganismos a 22°C e 36°C, estafilococos, coliformes, *E. coli*, enterococos, esporos e enumeração da *Legionella*. Parte dos meios de cultura necessários – como SLANETZ, LAURIL, CCA ou TSC – são previamente preparados na Sala de Preparação dos Meios e depois enviados para esta sala.

As águas para análise são divididas segundo o tipo de matriz. Tipos de Matrizes de Águas:

Matriz 1 – Águas minerais, de piscina e de consumo

Águas minerais e de piscina são usadas para fins recreativos, formativos, terapêuticos ou desportivos. Por sua vez, as águas destinadas ao consumo, incluem todas as que, tratadas ou naturais, servem para beber, cozinhar, fazer higiene pessoal ou outros fins domésticos, independentemente se é fornecida por uma rede fixa ou móvel ou se se encontra em recipientes, incluindo assim águas de nascente. Estas águas são essenciais no setor alimentar para fabrico, conservação e limpeza de superfícies ou de objetos neste tipo de setores. (7)

Procedimento: Filtração em membrana seguida de lavagem e inoculação direta. Tratamento térmico e tratamento ácido em meios GVPC e BCYE descrito na Tabela 3. (8)

Tabela 3 - Etapas tratamento térmico e ácido de águas da matriz 1

Tratamento ácido	Tratamento térmico
Pipetar 1 mL da amostra em 9 mL de solução ácida. Homogeneizar e deixar 5 minutos para atuar.	Colocar o frasco que contém a amostra durante 30 minutos no banho a 50°C.



Matriz 2 – Águas de torres de arrefecimento e águas de processo (incluindo biofilmes e zaragatoas)

Águas de processo abrangem diversos tipos de águas que não se destinam a consumo humano, como as usadas em torres de refrigeração, caldeiras e incluindo as águas usadas para fins industriais. Muito frequentemente analisadas para a presença de *Legionella* uma vez que esta bactéria coloniza facilmente em águas superficiais e em sistemas artificiais com condições favoráveis, como as tais torres de arrefecimento ou chuveiros.(7,9)

Procedimento: a amostra é plaqueada diretamente em meio GVPC por inoculação direta, com tratamento térmico e ácido.

Executar filtração com membrana e fazer a sua lavagem, inoculando-a diretamente de seguida, com tratamento térmico e ácido, em meio GVPC.(8)

Matriz 3 – Águas residuais e superficiais

Inclui águas que se encontram à superfície como lagos ou rios e águas residuais provenientes de atividades humanas (uso industrial ou doméstico), que requerem de tratamento apropriado em ETAR para serem reutilizadas (por exemplo, esgotos).(7)

Procedimento: é plaqueado diretamente da amostra para meio GVPC, com tratamento ácido e térmico combinados.

Nas diluições 1/10 e 1/100 da amostra, faz-se o plaqueamento para meio GVPC, com tratamento ácido e térmico combinados.(8)

1.3.3.1. Preparação e Processo de Filtração de Águas

Com as matrizes e respetivos tratamentos identificados, é essencial preparar corretamente o processo de filtração. Seguem-se, por isso, as etapas prévias à filtração.

Como a filtração por membrana é a fase mais demorada, foi uma das atividades que mais foi possível colaborar.

Antes de iniciar a filtração das amostras de água, é fundamental cumprir várias etapas preparatórias que garantem a fiabilidade dos resultados e evitam contaminações.



Para uma melhor visualização e compreensão do procedimento, estas etapas são apresentadas resumidamente na tabela seguinte (Tabela 4), indicando a sequência de ações, a sua descrição detalhada e os cuidados a ter em cada uma delas.

Tabela 4 - Etapas prévias e preparação de filtração por membrana de águas (4)

Etapa	Descrição Detalhada	Observações / Cuidados
1. Etiquetagem	Identificação das placas de Petri com as etiquetas emitidas no dia, de acordo com o meio e tipo de amostra.	Verificar correspondência correta entre frasco e placa para evitar confusões.
2. Desinfecção da bancada e rampa	Aplicar álcool em cada torneira da rampa, abrir o fluxo e esterilizar com chama, com a bomba de vácuo ligada.	Simula a filtração sem água, prevenindo contaminação cruzada.
3. Preparação das amostras	Agitar vigorosamente os frascos e posicioná-los atrás da rampa, alinhando cada frasco com a respetiva torneira.	Cada frasco deve corresponder à placa à frente da torneira; atenção ao manuseamento para evitar derrames.
4. Disposição das placas e membranas	Colocar as placas identificadas à frente de cada torneira (Figura 9); inserir membranas estéreis e copos de plástico esterilizados, escolhendo capacidade adequada (ex.: 250 mL para amostras de 1 L).	Evitar tocar no interior de copos ou membranas para não comprometer os resultados.
5. Filtração a vácuo	Verter cuidadosamente o volume de água da amostra (ex.: 100 mL) para cada copo; a água passa pela membrana que retém os microrganismos, com a bomba de vácuo ligada.	Evitar salpicos; garantir que todo o volume passa pela membrana.
6. Lavagem do copo	Filtrar pequenas quantidades de água estéril para lavar as paredes do copo, assegurando que toda a amostra foi incorporada na membrana.	Garante máxima recuperação dos microrganismos e evita perda de amostra.
7. Remoção do copo e membrana	Remove-se o copo e de seguida, com recurso a pinça esterilizada, retira-se cuidadosamente a membrana; esta não deve ficar com bolha junto ao meio de cultura. (Figura 10)	Para mais filtrações da mesma amostra mantém-se o copo; é descartado quando se troca de amostra.
8. Incubação das placas	Placas com membrana filtrada vão a incubar conforme as condições do microrganismo-alvo.	Conclui-se todos os passos associados à filtração por membrana.

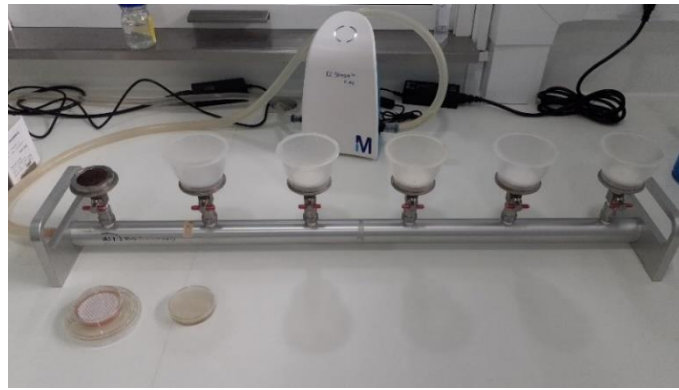


Figura 9 - Rampa de filtração por membrana

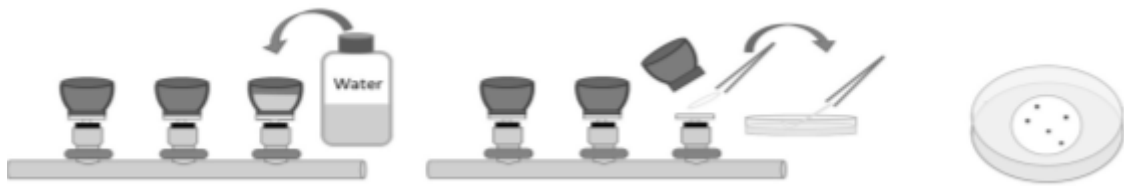


Figura 10 - Esquema representativo de filtração por membrana(10)

Exceções ao Procedimento de Filtração por Membrana de Águas

1. Início: receção da amostra
2. Verificar tipo de análise:

Contagem de Microrganismos a 22°C e 36°C(11)

Procedimento:

- Pipetar 1 mL da amostra ou diluição em duas placas de Petri
- Adicionar 15 – 20 mL de Extrato de Levedura Agar a cada placa
- Inversão das placas
- Placa 1 - incubar a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por $68 \pm 4\text{h}$
- Placa 2 – incubar a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por $44 \pm 4\text{h}$
- Contagem de colónias, após incubação

Contagem de Esporos Clostrídios Sulfito Redutores(12)

Procedimento:

- Aquecimento pré-filtração a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 15 minutos
- Filtração por membrana

3. Leitura de resultados obtidos



À semelhança das análises microbiológicas de alimentos, também nas águas existem fluxogramas que descrevem o procedimento interno de cada microrganismo e que se encontram arquivados digitalmente (Figura 11).

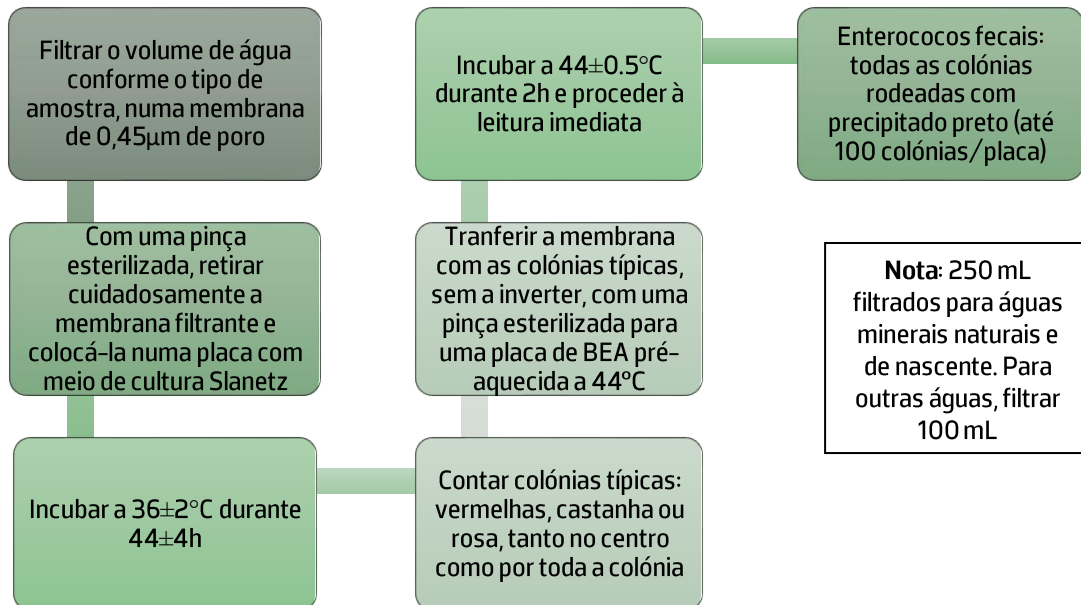


Figura 11 – Exemplo de fluxograma para análise de enterococos fecais



Capítulo II – Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó

1. Introdução

Desde os primórdios da humanidade, a alimentação tem desempenhado um papel fundamental na sobrevivência, promoção da saúde e bem-estar. O setor alimentar tem progredido de forma contínua o que acarreta desafios cada vez mais complexos no controlo daquilo que consumimos, como o consumimos e como o produzimos e armazenamos – aspetos fundamentais para garantir a segurança alimentar e confiança do consumidor.

Estima-se que cerca de 90% das contaminações de origem alimentar, são causadas por microrganismos, fazendo com que a análise microbiológica dos alimentos seja um dos pilares na manutenção da saúde pública. Existem diversos microrganismos, dos quais se destacam as bactérias pela sua elevada capacidade de multiplicação, sendo frequentemente encontradas em alimentos contaminados (cereais, água, carnes, peixes, arroz, saladas, conservas, entre outros). (13)

Um alimento particularmente relevante é o leite em pó, principalmente na alimentação infantil, pois é um substituto parcial ou total do leite materno durante vários meses de vida. (14)

1.1. Leite em Pó: Propriedades e Riscos

O leite em pó é estabelecido como a forma desidratada do leite, frequentemente produzido por *spray drying* (secagem por atomização), uma técnica de produção industrial que permite transformar líquidos em pó. Esta forma é mais fácil de armazenar, transportar e conservar por longos períodos, mas também proporciona condições favoráveis ao desenvolvimento de certos microrganismos resistentes ao calor. (15)

Quando a transição do leite materno para o leite em pó ocorre, o risco de infeções é maior, uma vez que a imunidade de um bebé, ou de uma criança desnutrida é menor que a de um adulto, sendo necessário assim, garantir que estes alimentos enlatados sejam produzidos e mantidos em boas condições microbiológicas. (16)

Neste tipo de alimentos enlatados, é necessário um controlo especial de esporos bacterianos pois estes podem surgir em concentrações bastante elevadas. (17) Os esporos bacterianos são resistentes ao processamento de alimentos e na conservação dos mesmos, a variações de temperatura, pH ou água. O seu maior habitat é o solo, com



concentrações significativas de algumas espécies formadoras de esporos como *Bacillus cereus* ou *Clostridium* spp., acabando por contaminar diretamente por exemplo, vegetais e animais de sangue quente que se encontram em quintas, sendo encontrados nas suas fezes e no leite que produzem. Contudo, a contaminação pelo solo raramente é a principal causa de contaminação.

Os locais de produção de alimentos, os equipamentos e materiais usados são fortes contaminantes de esporos resistentes às operações de limpeza e que são capazes de sobreviver e formar inclusive biofilmes, cuja presença persistente se verifica muitas vezes no leite e nos seus derivados. (18)

Para desencadear esporulação, é necessário, por exemplo, uma elevada densidade celular e alterações das condições do meio que favoreçam o processo.(17) Assim sendo, as bactérias esporuladas são consideradas um dos principais riscos durante o processamento térmico dos alimentos, semelhante ao que ocorre na produção do leite em pó.

1.2. Fatores promotores da esporulação bacteriana

As condições que desencadeiam a formação de esporos são diversas, mas estão intimamente relacionadas com a capacidade de adaptação aos stresses ambientais(19):

Limitação de nutrientes – adversidade que não permite a sobrevivência das células na forma vegetativa e desencadeia a esporulação.

Elevada densidade celular – as células vegetativas segregam feromonas que se acumulam em ambientes de elevada densidade celular ou biofilmes. Formam-se preferencialmente no topo das colónias ou dos biofilmes para obter oxigénio e se disseminarem mais facilmente, como em linhas de produção industrial. No entanto, há estirpes que se podem desenvolver em condições de anaerobiose.

Temperatura – perante temperaturas baixas, a esporulação é menor, mas mais duradoura, enquanto certas espécies, a temperaturas elevadas a concentração de esporos é mais elevada. Apesar de na produção alimentar existirem cuidados como o armazenamento a baixas temperaturas e manutenção frequente nas cadeias de frio ou calor, mesmo assim, ainda ocorre a esporulação em bactérias psicrófilas ou termófilas.

O pH, a presença ou não de água, determinados minerais presentes, outras microfloras envolvidas no meio ou efeitos da luz e do stress oxidativo, podem também fazer variar a forma como a esporulação ocorre e se ocorre. (19)

Todas as condições supracitadas podem ocorrer de forma combinada, desde as matérias-primas (animais ou vegetais), nos equipamentos que usam essas matérias-primas para a produção alimentar e até ao armazenamento do alimento (Figura 12).

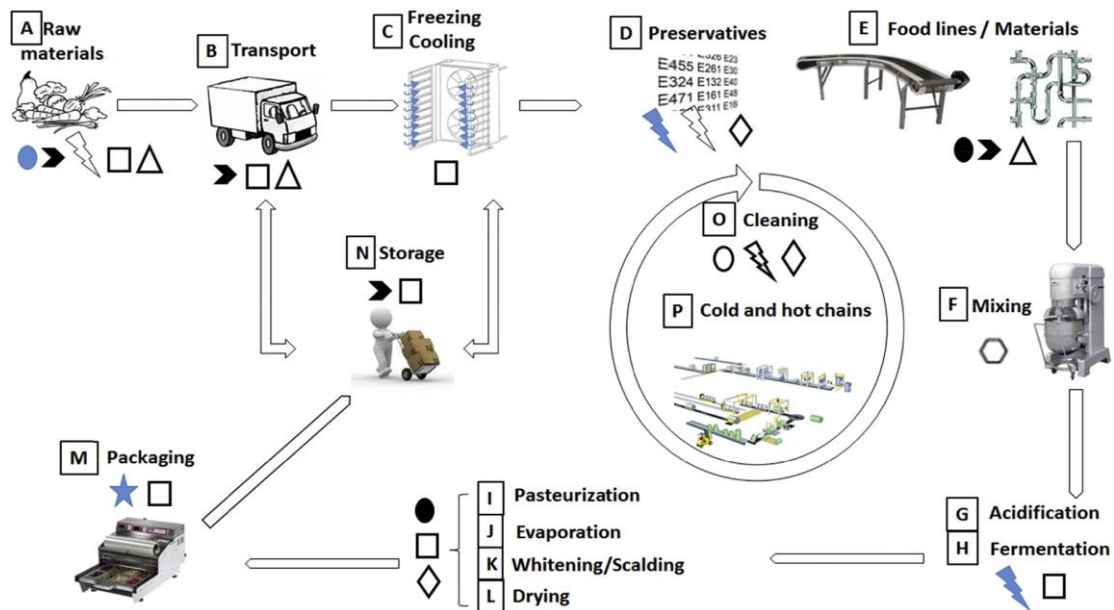


Figura 12 – Representação esquemática de processos favoráveis à formação de esporos segundo fatores ambientais. Antes dos processos de fabricação, durante e após (19)

As unidades de processamento de laticínios, são um modelo relevante para o estudo da esporulação porque durante as diferentes etapas de transformação do leite, em leite em pó, existem condições favoráveis para a esporulação. Desde o aquecimento até aos evaporadores, passando por vários níveis de temperatura (50°C, 45°C, 75°C) com a junção de longos ciclos de horas de tratamento, formam-se as condições ideais para que estas bactérias cresçam e formem esporos, como o caso de *Geobacillus stearothermophilus*. Nestes locais de temperaturas favoráveis para este tipo de bactérias termófilas bastante resistentes, se as operações de higienização não forem executadas de forma correta, pode também ocorrer contaminações cruzadas durante processos de fabricação através da acumulação de biofilmes nas superfícies e estruturas das fábricas, propagando-se para os leites.(19)

Assim sendo, embora se conheçam os fatores ambientais e as condições propícias que favorecem a formação de esporos, é muito difícil identificar com precisão os locais de maior ocorrência e o momento da iniciação da esporulação. A variação de lote para lote, depende do tipo de nutrientes do leite, dos minerais ou da concentração de lactose, por



exemplo. Além disso, as oscilações de temperaturas entre produções podem conduzir a níveis diferenciados de esporulação. (18, 19)

É possível identificar alguns géneros específicos de bactérias presentes, como por exemplo, no leite cru é mais comum encontrar espécies psicotróficas de *Bacillus*, espécies mesófilas nos produtos láteos e bactérias termófilas como o *G.stearothermophilus* são frequentes contaminantes do leite em pó.(19)

Mesmo em alimentos enlatados como o leite em pó, a ação do calor aplicado durante o fabrico e das elevadas temperaturas nos processos de fabrico não são suficientes para impedir o crescimento de microrganismos, sendo assim classificados como termófilos, pois resistem a elevadas temperaturas, conseguindo crescer entre 40°C a 75°C. Nestes produtos enlatados ocorre frequentemente uma deterioração termofílica denominada *flat-sour* que se denomina desta forma pois as bactérias que provocam este fenómeno produzem muito pouco gás ou mesmo nenhum, mantendo os enlatados com o seu aspeto normal plano, sem deterioração da embalagem como inchaço a indicar uma possível deterioração do alimento, muitas vezes acompanhada de cheiro "azedo". É causada por bactérias formadoras de esporos, termófilas e aeróbias facultativas, sendo as espécies típicas de provocarem esta deterioração a *G. stearothermophilus* (anteriormente designada de *Bacillus stearothermophilus*) e a *Bacillus coagulans*.

A presença de esporos termófilos, particularmente *G. stearothermophilus*, representa um desafio crítico para a qualidade e segurança de produtos láteos, devido às suas características de alta resistência térmica e de poderem originar deterioração *flat-sour*. Garantir métodos de deteção e quantificação fiáveis é, portanto, essencial para a segurança alimentar e o cumprimento de normas internacionais. (20)



1.3. *Geobacillus stearothermophilus*: agente de referência

Geobacillus stearothermophilus é uma bactéria Gram-positiva, em forma de cilindro, termofílica, aeróbia e formadora de esporos (Figura 13). Distingue-se pela sua resistência térmica excepcional, com um intervalo máximo de tolerância 65 a 75°C, demonstrando grande resistência ao calor. Não cresce abaixo de 37°C, tem crescimento ótimo de 55°C e tolerância a acidez limitada. É amplamente encontrada em solos, desertos, sedimentos marinhos, alimentos e compostos.(21)

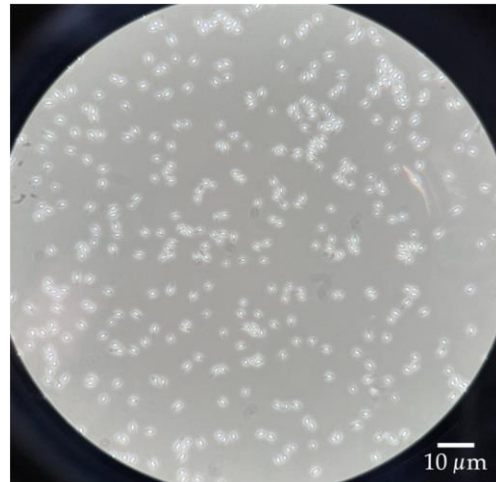


Figura 13 – Esporos de *G. stearothermophilus* (ATCC7953) sob microscopia de contraste de fase(100x)(42)

Esta espécie assume grande relevância na indústria alimentar, particularmente na produção do leite em pó e de alimentos enlatados, devido à sua capacidade de resistir a temperaturas até 121°C por determinados períodos. A presença de esporos de *G. stearothermophilus* é considerada normal em muitos produtos enlatados, não implicando necessariamente deterioração desde que sejam assegurados processos de arrefecimento, armazenamento e distribuição a temperaturas inferiores a 43 °C.(20)

É usado diversas vezes para tratamento térmico a 121°C de determinados alimentos e também como indicador biológico para validar a esterilização por calor húmido em autoclaves laboratoriais. Se forem detetados após o ciclo de esterilização, significa que o processo não foi eficaz.(20)

1.4. Procedimentos de Verificação e Critérios de Validação de Métodos Microbiológicos

Diversos métodos encontram-se disponíveis para a deteção de esporos, contudo, ainda não foi estabelecido um procedimento padronizado. A maioria baseia-se em estratégias de amostragem, na utilização de diferentes meios de cultura e técnicas de plaqueamento, ou mais frequentemente, no tratamento térmico a temperaturas elevadas para eliminação de células vegetativas e selecionar esporos, que pode ser combinado com diferentes tempos e temperaturas deste tratamento ou de incubação.(22)



Para aumentar a eficiência na deteção destes microrganismos em alimentos e a prevenção de contaminações, em especial no leite em pó onde *G. stearotherophilus* é frequente, os laboratórios de microbiologia alimentar recorrem a metodologias adequadas para o efeito. No entanto, novas abordagens são continuamente formuladas para facilitar e melhorar a análise e deteção destes desafiantes microrganismos. Antes da adoção de qualquer nova metodologia, é obrigatório proceder à sua verificação para confirmar a adequação ao fim previsto e permitir respetiva validação.(23)

Assim sendo, diz-se de validação de um método o processo de definição de um requisito analítico, em que após um estudo experimental sobre as amostras que queremos validar, confirmamos que o mesmo tem capacidades credíveis para as aplicações a que é necessário.(3)

1.5. Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo validar o método externo ao laboratório, denominado Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó, avaliando a sua eficácia e aplicabilidade à rotina de um laboratório de microbiologia alimentar.

1.6. Metodologia

Este caso de estudo baseou-se num tipo de estudo experimental de validação do método microbiológico detetando esporos aeróbios termófilos a 55°C em amostras de leite em pó de cliente, utilizadas em laboratório para este efeito.

1.6.1. Instrumentos e procedimentos

O método em estudo foi conduzido de acordo com protocolos e outra documentação de referência fornecidos pela entidade externa ao laboratório, assegurando a conformidade com as orientações estabelecidas.

O laboratório deve garantir na verificação de um método, que este apresenta condições para gerar dados e resultados similares ao da primeira validação externa. (23) O



método é fornecido por uma empresa, com uma matriz específica (leite em pó), e a implementação do ensaio realizou-se no laboratório de microbiologia da Silliker Portugal S.A..(3) Para melhor organização, a metodologia encontra-se estruturada em cinco secções principais: instrumentos e procedimentos, materiais e reagentes utilizados, preparação do meio de cultura, preparação das amostras e procedimento experimental.

Para a validação do método, é necessário constar as seguintes informações:

- Princípio do método
- Experiência do método
- Identificação das matrizes de rotina
- Produtividade dos meios de cultura
- Critério de Precisão
- Características de desempenho
- Exatidão
- Incerteza
- Qualificação de pessoal

Os dados obtidos através do protocolo de verificação do método variam conforme a matriz e o tipo de ensaio, por exemplo, se o tipo de ensaio é pesquisa ou contagem, o número de amostras, amostras que são necessárias ser positivas, bem como o número de brancos, duplicados e paralelos necessários.(23)

No caso do leite em pó, usado como matriz no método de quantificação de esporos, são requeridos os seguintes parâmetros, descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Características necessárias para validação de métodos de género alimentício (22)

<i>Matriz</i>	<i>Ensaio</i>	<i>Mínimo de amostras</i>	<i>Amostras positivas</i>	<i>Branco</i>	<i>Duplicados</i>	<i>Paralelos</i>
<i>Alimento</i>						
<i>(leite em pó)</i>	<i>Contagens</i>	<i>30</i>	<i>10</i>	<i>2</i>	<i>15</i>	<i>10</i>

Para este tipo de verificação de métodos é também necessário realizar um ensaio de comparação interlaboratorial (ECI). Caso não existam ECI acreditados, o laboratório deve inscrever-se nesses ECI'S não acreditados.

As principais características a avaliar em laboratório incluem:



- Eficiência – Número de colónias/ensaios totais corretamente atribuídas na contagem presumível.
- Especificidade – Número total de negativos, corretamente atribuídas na contagem presumível. Normalmente é >80%.
- Seletividade – Razão entre o número de colónias/ensaios-alvo com o número total de colónias. Se for <10% os resultados não são válidos.
- Sensibilidade – Capacidade de o método detetar o organismo-alvo. Número total de positivos corretamente atribuídos na contagem presumível.
- Taxa de falsos negativos – Número de negativos (colónias atípicas) que parecem ser colónias-alvo.
- Taxa de falsos positivos – Número de positivos (colónias típicas) que correspondem a organismos não-alvo.(23)

Para o cálculo da incerteza, são tidos em conta os valores de ensaios experimentais da precisão e da exatidão (não aplicável neste método, pois não foi executada), alinhada com outras fontes de erro. Os valores calculados são obtidos em paralelo entre pessoal técnico diferente e com recurso a impressos de reprodutibilidade entre analistas. Além disto, fontes como reagentes, equipamentos, ou condições ambientais podem gerar diferentes incertezas.(23)

1.6.2. Materiais e reagentes

Diluentes

- BPW – Buffered Peptone Water (Água peptonada tamponada)
- MRD – Maximum recovery diluente
- 40% NaOH – Hidróxido de sódio

Equipamentos e materiais

- Estufa regulada a $55 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Micropipeta capaz de dispensar 1 mL.
- Micropipeta capaz de dispensar 10 mL



- Densitómetro.
- Banho de água regulado a $100\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Banho de água regulado a $80\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Frigorífico regulado a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Autoclave regulado a 121°C durante 15 minutos
- *Dilumat*
- Balança de prato
- *Stomacher*

1.6.3. Preparação do Meio de Cultura Dextrose Triptona Agar

Na execução deste método, o meio de cultura usado foi DTA – Dextrose Triptona Agar, recomendado para a deteção e enumeração de microrganismos termófilos e mesófilos associados à deterioração *flat-soure* em alimentos enlatados, incluindo o leite em pó. (24)

Para facilitar o armazenamento e a utilização do DTA, o mesmo foi preparado em frascos de 500 mL, contendo 13,5 g do meio em pó de cor ligeiramente verde. Após a adição de 500 mL de água destilada, o meio adquiria cor arroxeadada/avermelhada. A suspensão foi homogeneizada, aquecida até fervura para completa dissolução e posteriormente autoclavada a 121°C durante 15 minutos. (25)

Todos os registos de preparação do DTA, datas de utilização, quantidades produzidas e todos os detalhes associados ao controlo de qualidade do mesmo, foram documentados no formulário interno IQ.40B – Controlo da qualidade dos meios de cultura – carta de controlo: Produtividade, que garantem a produtividade dos meios de cultura.

Adicionalmente, utilizou-se TSA em placa para fazer sementeira por estriamento da estirpe de referência (*G. stearothermophilus*), garantindo a obtenção de colónias isoladas para os controlos positivos e contaminação experimental das amostras.

1.6.4. Preparação das amostras de leite em pó para análise

O objetivo da preparação foi garantir uma suspensão inicial homogénea e representativa – distribuição o mais uniforme possível de microrganismos nas porções de



teste. Para produtos desidratados como o leite em pó, procedeu-se à reidratação das amostras para favorecer a revitalização de microrganismos submetidos a condições de stress.

Para métodos de teste de termófilos, como o caso deste, é necessária uma suspensão a 20%, ou seja, 20 ± 1 g de amostra de leite em pó em $80 \pm 0,5$ g de diluente, no caso de uma amostra homogénea como o caso do leite em pó. Após a pesagem da amostra num saco esterilizado é adicionado BPW (diluente) e a amostra é deixada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente) durante 30 ± 5 minutos antes da homogeneização. Esta homogeneização não necessita de ser feita no *stomacher*, pode ser feita manualmente.

Todo este processo de formar uma suspensão inicial, é feito com todos os cuidados enunciados na primeira parte deste relatório.

Para a contagem de esporos termófilos, é necessário testar pelo menos 2 g do material original. Para o alcançar, o número de alíquotas de 10 mL deve ser calculado, ou seja, número de alíquotas = $20 / \text{percentagem de concentração da suspensão (20\%)} = 1$.

Assim, para uma diluição com suspensão a 20%, deve ser testada uma alíquota de 10 mL por teste, num único frasco de DTA. (26)

1.6.5. Procedimento Experimental

Antes de iniciar o procedimento, é necessário estabelecer os controlos negativos, positivos. Brancos também foram executados (Figura 14).

Controlos positivos: microrganismos-alvo é o *Geobacillus stearothermophilus*, capaz de produzir colónias típicas no meio de cultura pretendido (Figura 15), adquirido externamente em formato de lentícula. É importante para demonstrar que o ensaio é realizado corretamente. (5)

Preparou-se uma suspensão dessa estirpe em diluente MRD e inoculou-se em placas de meio sólido TSA por estriamento com ansa, incubando a 55°C , de forma a criar colónias isoladas. As colónias isoladas foram armazenadas em frigorífico e repicadas sempre que necessário, garantindo viabilidade para os ensaios. (27)

Preparou-se uma suspensão bacteriana com turbidez ajustada para 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ ufc/mL), medida com densitómetro.

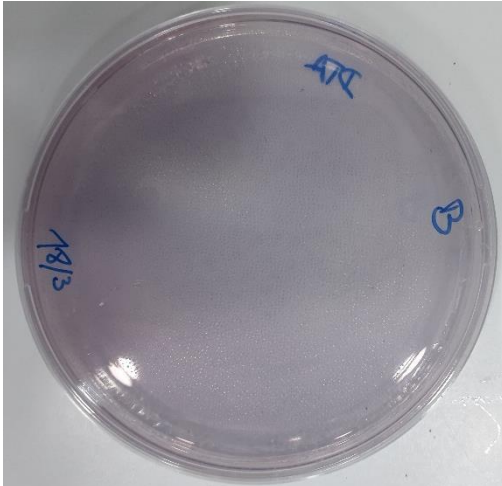


Figura 14- Ensaio em branco, sem estirpe

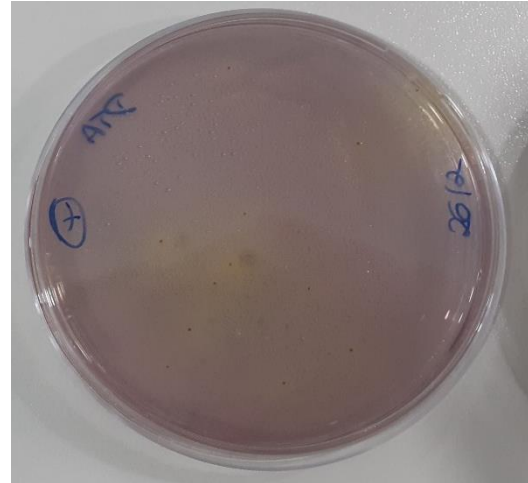


Figura 15 - Controlo positivo – inoculação do meio DTA com a estirpe de *G. stearothermophilus* que desenvolveu as colónias típicas expectáveis

Contaminação de amostras: amostras contaminadas com 1 mL da suspensão bacteriana previamente preparada (concentração cerca de 10^7 UFC/mL).

Realizaram-se duas diluições sucessivas em tubos de 9 mL de MRD a partir da suspensão-mãe contaminada, de forma a obter níveis de carga bacteriana adequada para a contagem e que não sejam influenciados pela matriz (Figura 16 e 17).

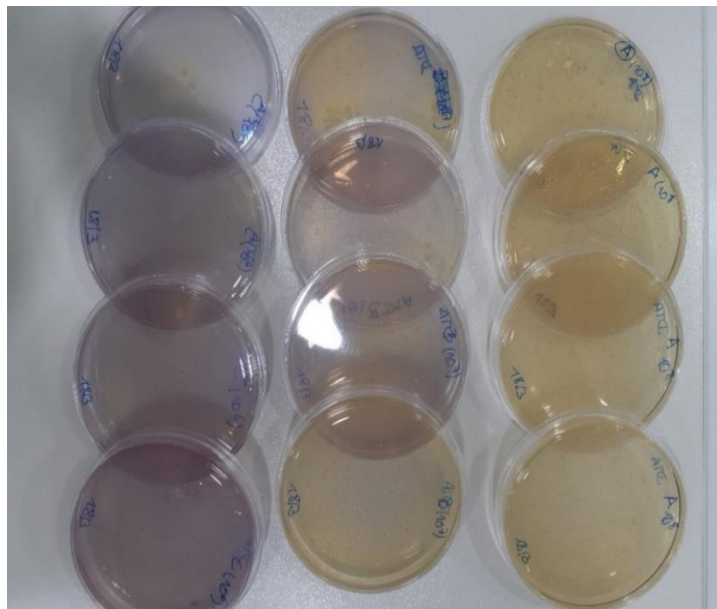


Figura 16 - Tentativas de diluição correta para permitir contagem das colónias típicas

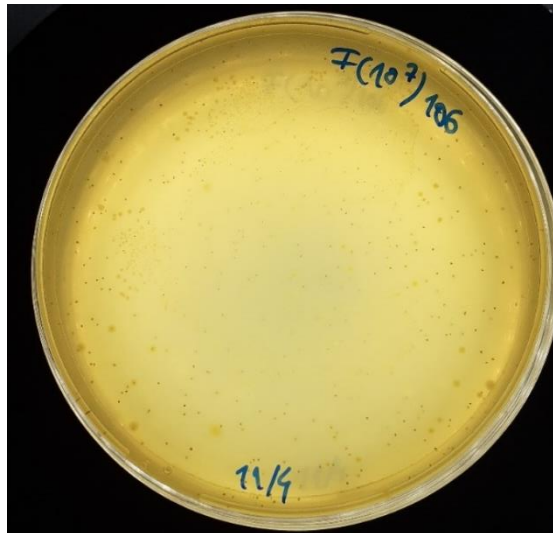


Figura 17 - Exemplo de colónias em excesso impossibilitando contagem, mesmo usando contador automático

Controlos negativos: para este controlo foi usado *E. coli*, seguindo o mesmo procedimento descrito para o controlo positivo. Assegurou que as colónias observadas no meio de ensaio correspondem ao microrganismo-alvo, evitando falsos positivos.(7)

Após a preparação das amostras de leite em pó como referido anteriormente, segue-se os seguintes passos, que estão representados de forma simplificada e prática no fluxograma do Anexo 1: (28)

- Identificação dos frascos com o respetivo número de amostra de leite em pó e respetivas diluições;
- Preparação e fusão dos frascos de DTA;
- Diluições sucessivas pipetando 1 mL em 9 mL de MRD (diluyente) a partir da suspensão-mãe. Foram feitas duas diluições por amostra uma vez que na testagem dos controlos positivos o número de contagem de colónias foi possível na primeira e segunda diluição, sem contar com a diluição feita na suspensão-mãe. Como seriam necessários 10 mL de suspensão para distribuir em cada frasco de DTA, em cada diluição por amostra, o primeiro tubo de MRD continha 10 mL para perfazer 11 mL após a diluição, e depois deste serem retirados 1 mL para a diluição seguinte, ficando o segundo tubo de MRD + suspensão com 10 mL totais. Por cada diluição, ocorre agitação no vórtex e são seguidos os cuidados como referidos no Capítulo 1;



- Distribuição de 70 mL de DTA fundido em cada frasco de aproximadamente 100 mL. Esta distribuição em frascos de menor volume serve para uma maior gestão de espaço e de número de amostras de acordo com a capacidade do banho a usar;
- Inoculação: $10 \pm 0,2$ mL de amostra de cada diluição, distribuídos por um frasco de DTA fundido. Enquanto este processo ocorre, o meio não se deve encontrar a menos de $80 \pm 1^\circ\text{C}$. Há a possibilidade de neste processo, ocorrer a mudança de cor do meio para amarelo devido à mudança significativa de pH. O rearranjo deverá ser feito com a adição de NaOH a 40% de forma cuidadosa, com recurso a pipeta de 1 mL, até o meio retornar à sua cor;
- Tratamento térmico: Os frascos de DTA inoculados são colocados no banho a $100 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 120 ± 1 min;
- Distribuição do conteúdo: são identificadas 4 placas de Petri com respetivo número e diluição de cada frasco e o conteúdo dos mesmos, que contém cerca de 80 mL (70 mL de DTA + 10 mL de amostra) e é distribuído pelas 4 placas, cerca de 20 mL para cada. São deixadas solidificar, o que deve acontecer em menos de meia hora.
- Incubação das placas a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 4 h. Colocar numa bandeja cobertas com um saco para evitar a evaporação durante a incubação. É aceitável incubar as placas por mais 48 h.
- Observação das placas incubadas para verificar as colónias típicas: colónias *flat-sour* (p.ex. *Bacillus stearothermophilus*) tipicamente redondas, com 2 a 5 mm de diâmetro e centro opaco rodeado por uma zona amarela que contrasta com a cor roxa do meio. As placas devem ainda ser lidas quentes, uma vez que o halo ácido acaba por desaparecer rapidamente à medida que o meio arrefece. Todas as colónias devem ser contadas, não apenas aquelas com halo. Não é aplicável confirmação das colónias.
- A contagem de esporos termófilos aeróbios deve ser registada em função do fator de diluição, com cada uma das quatro placas a ser registada individualmente e como contagem combinada. Os resultados devem ser representados da seguinte forma:
 - A contagem combinada das quatro placas representa o número de esporos em 2 g de material testado. Caso não existam colónias típicas detetadas, os resultados devem ser reportados como $<1/2$ g de material testado.



- A contagem combinada é multiplicada por 5 para expressar resultados do número de esporos para 10 g de material testado. Caso não existam colónias típicas os resultados devem ser representados como <math><5/10\text{ g}</math> de material testado.(28)

2. Tratamento e análise de dados

O método foi executado em apenas uma matriz, o leite em pó. Todos os dados foram registados e compilados na tabela constante no Anexo 2, contemplando, o número de amostras e data de análise, identificação do analista, os fatores de diluição, o tipo de análise que foi feita e o número total de colónias. Estes dados permitiram a elaboração de dois documentos internos do Laboratório de Microbiologia Alimentar da Silliker que comprovam a execução dos procedimentos de validação do método, o VM – Validação de Métodos e o PAM – Procedimentos relativos à análise microbiológica.

A avaliação de desempenho do método foi baseada no cálculo dos parâmetros especificados na Tabela 6, com recurso a fórmulas ISO (7218:2007, 16140-2:2016, 5725-2:1994) inseridas de forma automática em folhas Excel, garantindo consistência e minimizando erros manuais.

Tabela 6 – Parâmetros usados na avaliação do desempenho e concordância entre metodologias (Continuação página seguinte)

Parâmetro	Descrição	Fórmula
Sensibilidade	Representa a capacidade do método em detetar corretamente o organismo alvo, ou seja, quantos resultados realmente positivos o método deteta, representando o número total de colónias positivas corretamente atribuídas (29), com expectativa que seja >90%.	$S = \frac{VP}{VP + FN}$
Especificidade	O método é específico quando garante que o que está a ser analisado provém apenas do microrganismo-alvo, discriminando-o relativamente a outros organismos presentes na amostra, ou seja, a capacidade de o método reconhecer o que é negativo e excluí-los. (30) É dada assim pelo número total de negativos, corretamente atribuídos na contagem presumível. Normalmente é >80%. (23,31)	$E = \frac{VN}{VN + FP}$
Valor Preditivo Negativo	Mede a probabilidade de um resultado negativo estar correto.	$\frac{VPN}{VN + FN}$
Valor Preditivo Positivo	Mede a probabilidade de um resultado positivo estar incorreto.	$\frac{VPP}{VP + FP}$
Taxa de falsos negativos	Número de negativos (colónias atípicas) que parecem ser colónias-alvo, ou seja, das colónias atípicas, quais realmente não o são.(31)	$\frac{FNR}{FN + VP}$



Parâmetro	Descrição	Fórmula
Taxa de falsos positivos	Número de positivos (colónias típicas) que o parecem ser através de outros organismos não-alvo, ou seja, das colónias realmente positivas quantas são incorretas. (23, 31)	$FPR = \frac{FP}{FP + VN}$
Eficiência	Número de colónias/ensaios totais corretamente atribuídas na contagem presumível, ou seja, representa a proporção entre os resultados corretos, sejam eles positivos e negativos, com o total. (23, 31)	$ER = \frac{VP + VN}{TOTAL(n)}$
Seletividade	É a capacidade de o método identificar e distinguir um microrganismo em particular numa mistura com outros sem interferência dos outros componentes, detetando apenas aquilo que é necessário. (32, 30) É a razão entre o número de colónias/ensaios-alvo com o número total de colónias, representado assim os verdadeiros positivos no total da amostra. Se for <10% os resultados não são válidos. (31)	$SE = \frac{VP}{n}$
Precisão	Grau de concordância entre resultados de ensaios individuais e em tempos diferentes, sejam eles repetidos sobre uma mesma amostra ou em amostras semelhantes, com condições definidas pelo laboratório como os equipamentos ou os funcionários. (23, 29, 31) Valores de duplicados <10 ou não quantificáveis, são descartados. Associada à repetibilidade (seu desvio), reprodutibilidade e critério de precisão. (30)	$S_r = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$
Incerteza	Requisito fundamental para garantir a confiabilidade e a rastreabilidade dos resultados analíticos em microbiologia. Incerteza associada à contagem de esporos termófilos de <i>G. stearothermophilus</i> em condições de aerobiose a 55 °C em leite em pó, seguiu os princípios estabelecidos pela norma ISO 7218. (31) As contagens foram convertidas em médias ponderadas e posteriormente transformadas em escala logarítmica (\log_{10}), de modo a reduzir a dispersão típica de dados microbiológicos. A partir da diferença entre os resultados obtidos pelos dois analistas, foi calculada a variância , que serviu de base para a estimativa do desvio-padrão (σ) e da incerteza expandida ($U = k \cdot \sigma$, com $k=2$ para nível de confiança de 95%)	$U = k \cdot \sigma$

Legenda: VP – verdadeiros positivos; VN – verdadeiros negativos; FN – Falsos negativos; FP – falsos positivos; n – número total de pares de resultados; S_r – desvio-padrão de repetibilidade; x_i – resultados individuais; \bar{x} – média; n – número total de ensaios; U – variância; σ – desvio-padrão;

2.1. Questões éticas

O estudo foi autorizado pela direção do laboratório, devido ao interesse na melhoria dos procedimentos laboratoriais e da qualidade dos processos analíticos. A execução do método respeitou todas as normas em vigor.



3. Resultados

Para a verificação do método foram analisadas 38 amostras, entre as quais estão incluídas amostras de clientes (não contaminadas, naturalmente contaminadas e contaminadas artificialmente).

3.1. Características de desempenho

Das 38 amostras analisadas resultaram 82 ensaios no total. Desses, 63 corresponderam a amostras contaminadas artificialmente; 15 referem-se a amostras não contaminadas, analisadas em duplicado ou em paralelo para confirmar a ausência do microrganismo-alvo; 4 resultados provieram de amostras com contaminação natural, não consideradas no cálculo do desempenho do método, mas cujo registo é de importância.

A contagem total do número de colónias foi sempre considerada como o somatório das 4 placas por ensaio, com resultados calculados para 2 g e 10 g de material conforme pedido no procedimento externo, e cujo exemplo se apresenta na Tabela 7.

Tabela 7 – Exemplo de uma amostra e respetivos registos necessários para a compilação de contagens de esporos aeróbios termófilos a 55°C em amostras de leite em pó

Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Nº colónias (c1)	Fator diluição (d1)	Nº colónias (c2)	Fator diluição (d2)	Resultado (UFC /2g)	Resultado (UFC /10g)
18/03 /2025	8423 100	BR	Leite em pó	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	92	2	30	3	122	610
		BR			122	2	24	3	146	730

Na Tabela 8 está representado de forma sintetizada os resultados constantes no Anexo 2.



Tabela 8 – Resumo das amostras analisadas para a contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C no leite em pó (continuação página seguinte)

Lote de Leite em Pó	Condição	Número de Repetiçõess	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)	Observações
8099087	Sem contaminação	1	0	0	Sem crescimento
8170170	Sem contaminação	2	0;0	0;0	Sem crescimento
8423256	Sem contaminação	2	0;0	0;0	Sem crescimento
8423100	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	122;146	610;730	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8353282	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	1	19	95	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8353280	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	1	27	135	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8353359	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	1	18	90	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8364036	Sem contaminação	1	0;0	0;0	Sem crescimento
8353239	Contaminação natural	1	6	30	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8478460	Contaminação natural	1	18	90	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8478721	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	59;36;37	295;180;185	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8423244	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	108;180	540;900	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8560349	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	56;100;106;99	280;500;530;495	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8577898	Sem contaminação	1	0;0;0	0;0;0	Sem crescimento
8594741	Contaminação natural	2	4;3	20;15	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8594730	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	330;392	1650;1960	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8595201	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	241;437;337;223	1205;2185;1685;1115	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8594743	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	328;327;263;328	1640;1635;1315;1640	Contagem total para 4 placas – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas.
8621121	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	69;69;67	38;49;43	Com crescimento – colónias típicas 2–5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas



Lote de Leite em Pó	Condição	Número de Repetições	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)	Observações
8621106	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	38;49;43	190;245;215	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8627475	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	107;70;74;45	535;350;370;225	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8542311	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	115;69;37	575;345;185	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8627460	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	72;93	360;465	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8668298	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	292;328;195;152	1460;1640;975;760	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8542380	Contaminado com <i>E. coli</i> (controlo negativo)	2	0;0	0,0	Sem crescimento
8627468	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	4	15;194;142;115	575;970;710;575	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8627464	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	202;207;201	1010;1035;1005	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8716016	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	1	314	1570	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8715983	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	371;210	1855;1050	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8716145	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	291;253	1455;1265	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8716235	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	3	205;213;215	1025;1065;1075	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8716237	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	2	290;279	1450;1395	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8731088	Sem contaminação	1	0	0	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas
8731095	Sem contaminação	1	0	0	Sem crescimento
8731100	Sem contaminação	1	0	0	Sem crescimento
8731104	Sem contaminação	1	0	0	Sem crescimento
8731110	Sem contaminação	1	0	0	Sem crescimento
8730903	Contaminado com <i>G. stearothermophilus</i>	1	229	1145	Com crescimento – colónias típicas 2-5mm com halo amarelo. Sem halo também devem ser contadas

A formulação deste método baseou-se no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods – 2015*, nomeadamente no que toca à interpretação da contagem das colónias.

As colónias típicas desejáveis apresentam 2-5mm de diâmetro, de forma arredondada e centro opaco, com halo amarelo a contrastar com o meio (Figura 18). O método assume que todas as colónias devem ser contadas, mesmo as que não são consideradas típicas *flat-sour* – colónias compactas e biconvexas, podendo ter forma de pontos. (20,28)

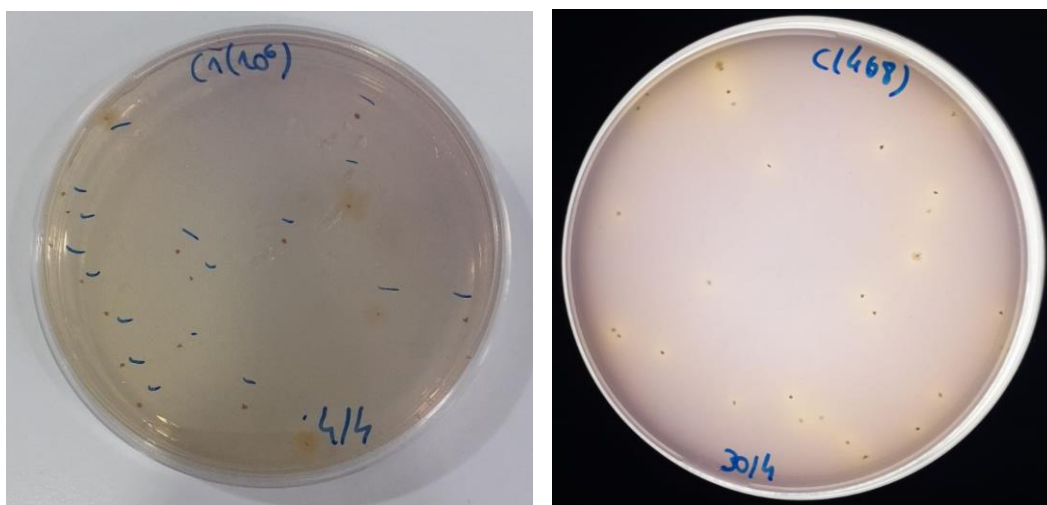


Figura 18 – Exemplo de colónias típicas desejáveis para contagem em placa

Quando o indicador de pH do meio DTA (bromo cresol roxo) torna o meio mais ácido devido à ação de algumas bactérias presentes no leite em pó, a cor do meio muda de roxo para amarelo, dificultando a interpretação (Figura 19 e 20).

Além disto, houve sempre algum depósito de leite em pó nas placas de DTA, o que tornou a contagem de colónias um pouco mais desafiante – meio torna-se mais claro e halo amarelo das colónias típicas menos notório (Figura 19 e 20). Este método não requer confirmação das colónias.

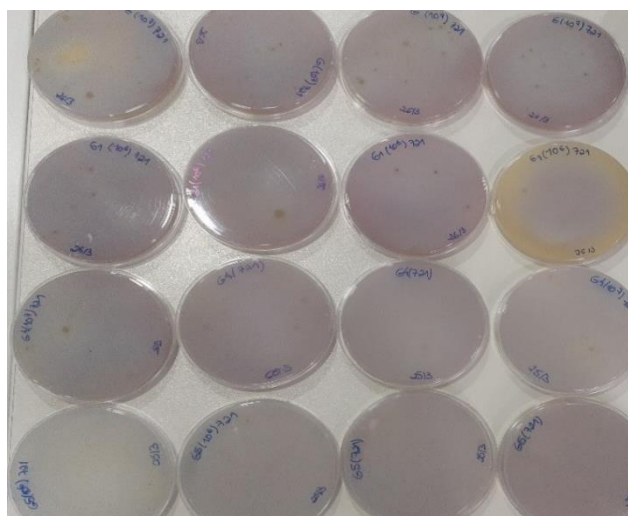


Figura 19 – Resultados de uma mesma amostra de leite em pó contaminada por *G. steurothermophilus*, a quadruplicar, evidenciando as colónias expectáveis

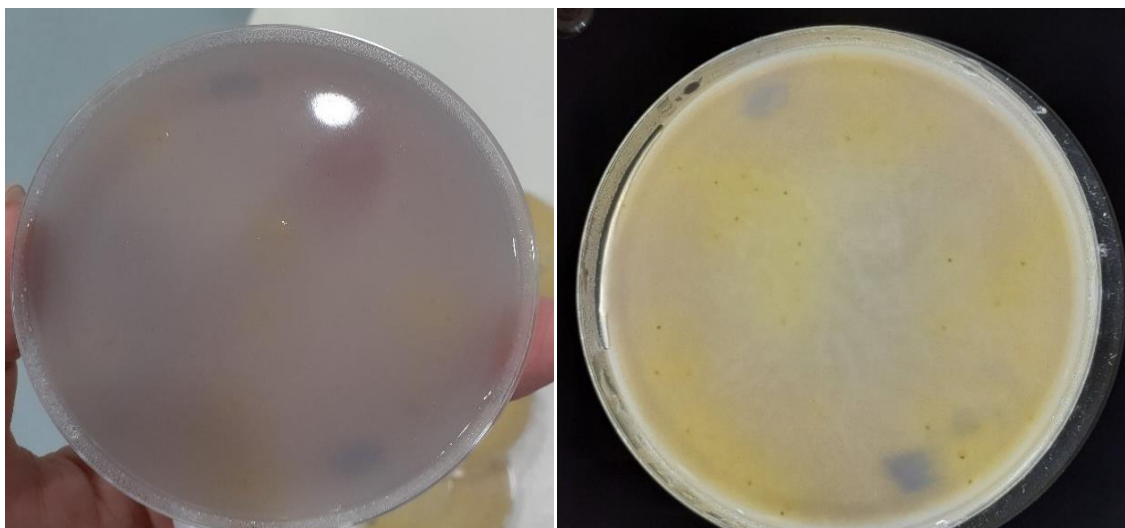


Figura 20- Colónias de *G. stearothermophilus* em meio DTA resultantes de amostra de leite em pó contaminada. Evidente a alteração de tonalidade do meio e maior dificuldade de contagem tanto a olho nu como no contador automático de colónias típicas

3.1.1. Estudo da Precisão

A precisão do método foi avaliada através da análise em duplicado de 17 amostras independentes de leite em pó contaminado com *G. stearothermophilus*, analisadas em dias diferentes e envolvendo todo o equipamento e técnicos que efetuam os ensaios de rotina.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 9, que apresenta os valores brutos (duplicatas D1 e D2), os logaritmos correspondentes, o cálculo do desvio-padrão e as amplitudes R ($|\text{Log}_1 - \text{Log}_2|$). Os resultados alargados constam do Anexo 3.

Tabela 9 - Valores de duplicados e logaritmos correspondentes. Desvio-padrão e suas amplitudes. Cálculo do critério de precisão

Data	Nº amostra	Duplicado (D ₁)	Duplicado (D ₂)	Log ₀₁	Log ₀₂	Amplitudes R(Log)= (Log ₀₁ - Log ₀₂)
18/03/2025	8423100	122	146	2,09	2,16	0,078
25/03/2025	8478721	59	36	1,77	1,56	0,215
26/03/2025	8423244	108	180	2,03	2,26	0,222
28/03/2025	8560349	56	100	1,75	2,00	0,252
04/04/2025	8594730	330	392	2,52	2,59	0,075
08/04/2025	8595201	337	223	2,53	2,35	0,179
08/04/2025	8594743	327	263	2,51	2,42	0,095
08/04/2025	8594743	328	328	2,52	2,52	0,000
15/04/2025	8627460	72	93	1,86	1,97	0,111
24/04/2025	8668298	292	398	2,47	2,60	0,135
30/04/2025	8627468	115	194	2,06	2,29	0,227
30/04/2025	8627464	202	207	2,31	2,32	0,011
02/05/2025	8715983	371	210	2,57	2,32	0,247
06/05/2025	8716145	291	253	2,46	2,40	0,061
06/05/2025	8716235	213	215	2,33	2,33	0,004
06/05/2025	8716237	290	279	2,46	2,45	0,017
08/04/2025	8594743	328	328	2,52	2,52	0,000
Média das amplitudes (\bar{R}) = 0,113						
Critério de Precisão (CP)=3,27* \bar{R} =0,37						



A partir da Carta de duplicados (Figura 21), a análise dos resultados expressos em \log_{10} (UFC/g) permitiu estabelecer o Critério de Precisão de 0,37 log. Este critério representa o limite de aceitação definido para este método, ou seja, qualquer desvio-padrão calculado abaixo deste valor indica que o método é considerado preciso segundo o critério do laboratório. (27)

O desvio-padrão de repetibilidade foi calculado segundo a norma ISO 5725-2, obtendo-se: $s_r = 0,091$, representando a variação real observada quando o método é repetido. O limite de repetibilidade foi definido como $2,8 * s_r = 0,255$, valor de intervalo máximo entre dois resultados repetidos.

Na Figura 21 representa-se graficamente a carta de duplicados, onde estão evidenciadas as amplitudes R ao longo do período de ensaio.

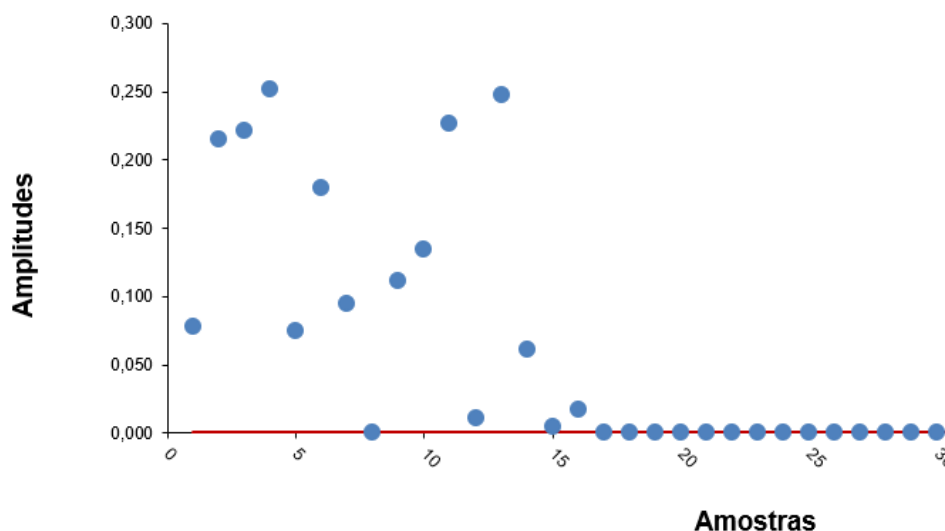


Figura 21 – Representação gráfica da Carta de duplicados de amostras analisadas de leite em pó para contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C. Eixo X encontram-se as amostras e no eixo Y estão as amplitudes

Verificou-se que a maioria das amplitudes se concentram próximo de zero, indicando boa repetibilidade, salvo raras exceções de resultados com maior dispersão. De acordo com o método, os resultados foram calculados considerando 2 g e 10 g de amostra, mas encontram-se expressos em log UFC/g, já normalizados.



3.1.2. Estudo da Sensibilidade e Especificidade

As amostras com contaminação natural não foram integradas no estudo da sensibilidade e especificidade. Assim, foram analisados 78 ensaios, dos quais 63 corresponderam a amostras contaminadas artificialmente e 15 a amostras não contaminadas. A matriz 2x2 obtida é apresentada na Tabela 10 com os resultados.

Tabela 10 - Resultados presuntivos e confirmatórios para avaliação da sensibilidade e especificidade do método (31)

Ensaio presuntivos			
	+	-	
Confirmados (+)	63 (VP)	0 (FN)	63 (VP + FN)
Confirmados (-)	0 (FP)	15 (VN)	15 (FP + VN)
	63 (VP + FP)	15 (FN + VN)	78 (n)

Recorrendo às fórmulas de cálculo apresentadas na metodologia deste método, obteve-se um valor de sensibilidade de 100 % e especificidade de 100 %.

3.1.3. Taxa de Falsos Positivos e Negativos

Pela aplicação das fórmulas de cálculo quer dos falsos positivos quer dos falsos negativos, observou-se 0% de casos.

3.1.4. Seletividade e Eficiência

Através das fórmulas de cálculo, o protocolo demonstrou ter uma boa seletividade (81%) para esporos aeróbios termófilos, garantindo que as colónias observadas correspondiam ao microrganismo-alvo (*G. stearothermophilus*).

A eficiência global – proporção de esporos recuperados em relação ao inóculo conhecido – manteve-se dentro dos valores recomendados para métodos de enumeração de esporos em leite em pó, com resultado de 100%.



Decorrente dos resultados da Tabela 10, constata-se que o método identificou corretamente todas as amostras positivas e negativas, sem ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos.

Assim sendo, a sensibilidade foi de 100%, especificidade de 100%, o valor preditivo positivo de 100% e o valor preditivo negativo de 100%. Contudo, quando a estimativa pontual é 100%, é essencial apresentar o intervalo de confiança (IC 95 %) para a proporção, que reflete a incerteza amostral (particularmente importante quando o número de negativos/positivos verdadeiros é pequeno). Desta forma, a análise de incerteza amostral através de intervalos de confiança (método de Wilson, 95 %) revela limites inferiores distintos de 100%.

A Tabela 11 apresenta de forma resumida o resultado de todos os parâmetros estabelecidos anteriormente e respetiva estimativa pontual e intervalo de confiança.

Tabela 11 – Resultado dos parâmetros que caracterizam o desempenho do método, estimativa pontual e intervalo de confiança de cada um deles

Parâmetros de desempenho	Resultado	Estimativa pontual (%)	IC 95 % (Wilson)
Sensibilidade	$\frac{63}{(63 + 0)}$	100,0	94,3 – 100,0
Especificidade	$\frac{15}{(0 + 15)}$	100,0	79,6 – 100,0
Valor Preditivo Positivo	$\frac{63}{(63 + 0)}$	100,0	94,3 – 100,0
Valor Preditivo Negativo	$\frac{15}{(15 + 0)}$	100,0	79,6 – 100,0
Taxa de falsos negativos	$\frac{0}{(0 + 15)}$	0,0	0.0% – 5.7%
Taxa de falsos positivos	$\frac{0}{(63 + 0)}$	0,0	0.0% – 20.4%
Seletividade	$\frac{63}{78}$	81,0	94.3% – 100.0%
Eficiência	$\frac{(63 + 15)}{78}$	100,0	95,3 – 100,0



3.1.5. Estudo da Incerteza

Para a estimativa da incerteza foram selecionadas múltiplas amostras representativas, submetidas à análise independente por dois analistas (Analista A e B), de forma avaliar a reprodutibilidade intra-laboratorial.

Os valores calculados são obtidos em paralelo entre pessoal técnico diferente e com recurso a impressos de reprodutibilidade entre analistas. Para a contagem de esporos termófilos de *G. stearothermophilus* em condições de aerobiose a 55°C em leite em pó, foi estimada a incerteza usando 23 resultados (Tabela 12). A tabela de resultados mais expandida baseada no impresso IQ.334.0 Cálculo da incerteza da medição – Microbiologia – Alimentar, documento interno, encontra-se no Anexo 4.

Do conjunto de amostras analisadas, observa-se que a maioria apresenta uma boa concordância entre analistas, traduzida em diferenças logarítmicas reduzidas e variâncias próximas de zero. No entanto, algumas amostras evidenciam discrepâncias mais acentuadas, influenciando o valor médio da variância.

De acordo com os cálculos apresentados na tabela da Figura 24 no Anexo 4 e após tratamento estatístico das diferenças entre analistas, obteve-se um desvio-padrão global de $S_{RI} = 0,24 \log$, representando a magnitude da dispersão entre as contagens obtidas pelos dois analistas em condições equivalentes de ensaio. Este valor representa a variabilidade intra-laboratorial associada à contagem de esporos termófilos de *G. stearothermophilus* em condições de aerobiose a 55°C em leite em pó.



Tabela 12 – Resultados das amostras executadas em paralelo, usadas para o cálculo da incerteza de medição

Data	Nº Amostra	Analista A – Média ponderada	Analista B – Média ponderada	Log Analista A	Log Analista B	Diferença (LogA – LogB)	(Diferença) ²	Variância
25/03/2025	8478721	16	17	1,214	1,2258	-0,0119	0,0001	0,0000708
28/03/2025	8506349	48	45	1,683	1,6532	0,0297	0,0009	0,00044
28/03/2025	8506349	289	25	2,461	1,4058	1,0553	1,1136	0,557
28/03/2025	8506349	45	45	1,653	1,6576	-0,004	0,000	0,00000935
08/04/2025	8559201	110	199	2,040	2,2981	-0,2585	0,0668	0,0334
08/04/2025	8559201	153	199	2,185	2,2981	-0,1129	0,0127	0,00637
08/04/2025	8559201	101	110	2,006	2,0396	-0,0337	0,0011	0,000568
08/04/2025	8594743	149	149	2,173	2,173	-0,0013	0,0000	0,000508
11/04/2025	8621121	31	31	1,496	1,4964	0,000	0,0000	8,79E-07
11/04/2025	8621121	31	30	1,496	1,4837	0,0128	0,0002	0,0000
11/04/2025	8621106	17	22	1,237	1,3478	-0,1104	0,0122	0,0000816
11/04/2025	8621106	20	22	1,291	1,3478	-0,0567	0,0032	0,00610
11/04/2025	8621106	20	17	1,291	1,2374	0,0537	0,0029	0,00161
15/04/2025	8627475	32	49	1,503	1,6870	-0,1843	0,0340	0,00144
15/04/2025	8627475	20	32	1,311	1,5027	-0,1919	0,0368	0,0170
15/04/2025	8627475	49	20	1,687	1,3108	0,3762	0,1415	0,0184
15/04/2025	8627475	20	34	1,311	1,5268	-0,2160	0,0467	0,0708
15/04/2025	8542311	31	52	1,496	1,7183	-0,2218	0,0492	0,0233
15/04/2025	8542311	31	17	1,496	1,2258	0,2706	0,0732	0,0246
24/04/2025	8668298	133	89	2,123	1,9476	0,1753	0,0307	0,0366
24/04/2025	8668298	149	69	2,173	1,8394	0,3340	0,1116	0,0154
24/04/2025	8668298	89	69	1,948	1,8394	0,1082	0,0117	0,0558
30/04/2025	8627464	92	91	1,963	1,9608	0,0022	0,000	2,32E-06



4. Discussão

De acordo com os resultados da sensibilidade, especificidade, VPN, VPP, seletividade, eficiência e precisão, verificou-se que os dois primeiros apresentam valores ótimos (100%), significando que este método é capaz de detetar todas as colónias verdadeiramente positivas e que não houve nenhum falso negativo (FN=0) além de identificar todos os casos verdadeiramente negativos de forma correta (VN=0).

Os resultados da Taxa de Falsos positivos e da Taxa de Falsos negativos, ambas a 0% estão de acordo com os 100% da sensibilidade e especificidade, onde nenhuma situação de colónias negativas marcadas como positivas e nenhuma colónias positivas excluídas, respetivamente.(33, 34)

81% das amostras ou colónias analisadas foram corretamente identificadas como sendo do microrganismo-alvo. Apesar de não existirem falsos positivos e falsos negativos, este resultado de seletividade provavelmente resulta de colónias-alvo que não cresceram ou não foram corretamente identificadas, devido por exemplo, a interferência da matriz ou do meio. Além disto, como os resultados não englobaram ensaios de amostras com contaminação natural, em condições reais a seletividade do método pode variar, nomeadamente se existir a presença de outros microrganismos.

Apesar dos resultados apresentarem boa seletividade (81%) e eficiência (100%) para o uso deste método face a *G. stearothermophilus* em leite em pó, a robustez estatística de tais conclusões seria beneficiada se o tamanho amostral fosse maior.

A precisão da reprodutibilidade, expressa como desvio-padrão 0,37 log. Um desvio de 0,37 log indica que os resultados poderão variar dentro deste valor, ou seja cerca de 2 a 3 vezes ($10^{0,37} \approx 2,34$) acima ou abaixo da média. Segundo a literatura, precisões $\leq 0,50$ log são aceitáveis para contagens de microrganismos, podendo assumir-se que o método é aceitável e tem baixa carga de esporos por grama de leite em pó, como é esperado neste tipo de amostras termicamente tratadas. (35)

O valor da incerteza obtido foi 0,24 log, implicando que o valor verdadeiro de UFC/2g pode variar $\pm 0,24$ log. Esta incerteza é considerada baixa e aceitável, uma vez que segundo determinadas normas como a ISO 16140, pode ser aceite se $\leq 0,5$ log, representando assim reduzida margem de erro. (36)



No conjunto dos parâmetros avaliados, podemos assumir que o método executado se demonstrou sensível, específico, eficiente, preciso e com baixa incerteza, enquadrando-se nas normas internacionais. Sustenta a sua aplicação em laboratório como uma alternativa fiável para a contagem de esporos aeróbios termófilos no leite em pó.

Apesar dos resultados favoráveis, espécies altamente resistentes a temperaturas elevadas como o *G. stearothermophilus* tornam toda a garantia de segurança alimentar mais exigente. Como existem diversas ocasiões em que esta temperatura é ultrapassada, são várias as tentativas que vão sendo feitas para encontrar o método ideal para a contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C no leite em pó, variando-se alguns fatores que podem melhorar a deteção destes organismos tanto neste método, como em outros que possam ser futuramente estudados.

Por exemplo, no método realizado apenas se procedeu à contagem dos esporos em placa, o que pode subestimar o número real de esporos viáveis, uma vez que alguns não germinam ou são danificados durante o processamento. Estudos demonstram que métodos moleculares como PCR quantitativo ou técnicas de microscopia são capazes de detetar em maior número células do leite em pó do que em placa, pois muitas destas não sobrevivem ao processamento. Adicionalmente, a utilização de DNase I demonstrou não afetar a viabilidade das células e degradar DNA de células mortas sem prejudicar a viabilidade das vivas, possibilitando desta forma diferenciar células vegetativas viáveis e esporos vivos no leite em pó, focando apenas no que está realmente viável. (37)

Outro fator relevante para métodos de análise de esporos termófilos é o choque térmico prévio. Algumas espécies de esporos para serem detetáveis, podem necessitar de mais tempo de choque térmico ou mais temperatura, como o caso do método deste estudo que se focou nos esporos de *G. stearothermophilus*. (18,38) Tal acontece também em métodos que usam 80°C por 12 minutos (mais indicado para esporos mesófilos de *Bacillus* spp.) ou 100°C por 30 minutos para esporos mais resistentes como *Anoxybacillus flavithermus* e *Geobacillus* spp. Assim, a seleção adequada de tempo e temperatura de choque térmico influenciará quais esporos serão recuperados. (18, 38, 39)

Conforme se aumentam os níveis de temperatura nos choques térmicos, das únicas espécies que prevalecem são *G. stearothermophilus*, apresentando uma resistência de 125°C por 30 min e mostrando ser um dos esporos aeróbios do grupo *Bacillus* com maior resistência ao calor. (40)



Esporos geralmente não são patogênicos, mas os deste género produzem uma enorme atividade lipolítica, sendo capazes de deteriorar os produtos láteos através das suas enzimas, conferindo diferentes sabores e texturas ao leite em pó. Contudo, esporos mesófilos acabam por ter maior importância no que toca a contaminações, uma vez que são em maior número os alimentos que não requerem elevadas temperaturas de produção e também atuam através das suas lípases e/ou proteases. (40)

Estes estudos confirmam assim, a concordância entre a estirpe de referência usada para validar este método ser *G. stearothermophilus*, tendo em conta as condições de elevado choque térmico a que seria exposto (100°C por 120 minutos) e estando de acordo com o tipo de matriz usada pelas suas condições de produção.

Contagens de esporos mais elevadas indicam que o tratamento térmico possa ter sido mais reduzido, enquanto contagens mais baixas possam significar um tratamento mais agressivo. No entanto, outro tipo de combinações como o meio de cultura usado ou a temperatura de incubação também podem influenciar nesta contagem. Por exemplo, no método em questão, foi usado o meio DTA por ser um meio de cultura com os componentes ideais para a deteção de esporos bacterianos em especial para bactérias do tipo *flat-sour*, apesar de outros métodos já existentes usarem o meio de cultura TSC. (18)

É igualmente importante considerar outras variáveis passíveis de alterar os resultados dos parâmetros representados na Tabela 11, como a diferença no tipo de amostras de leite em pó, se são processadas todas da mesma forma (cada processo que ocorre na produção de leite em pó influencia no tipo e quantidade de esporos que possam estar presentes), diferentes operadores a executar o método ou diferentes equipamentos e/ou utensílios que possam ser usados.

Não existe nenhum método *standard* para a contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C no leite em pó, nem está propriamente definido um limite para os esporos deste tipo. No entanto, estudos apontam para valores <500 e <1000 ufc/g, onde o rigor para estes valores é mais notório em casos de fórmulas infantis. (18)

De forma a minimizar erros, é também importante na execução do método a validar, que todas as informações específicas relativas ao procedimento sejam fornecidas e bem detalhadas.

Devido à matriz ser o leite em pó, e ser considerada uma matriz homogénea, foi realizada uma suspensão-mãe de 20 g de leite em pó 80 g de diluente. Contudo, durante a

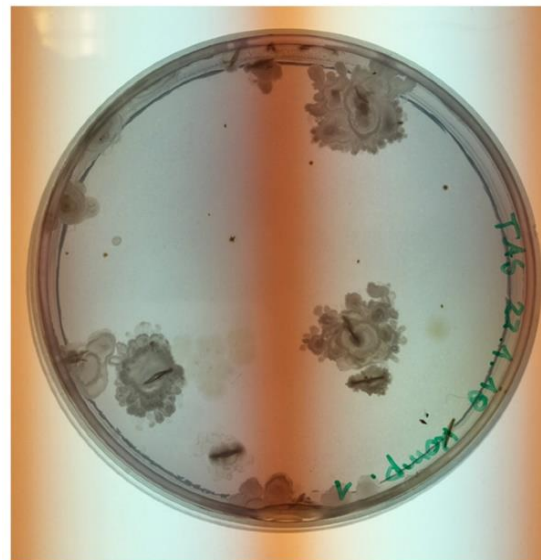


contaminação das amostras, chegou-se à conclusão que era impossível a contagem de colónias de esporos em placa sem existir diluições na análise, pois a junção das colónias com o leite em pó que se depositava na placa, não permitiam contagens nem diferenciação. Foi considerada a utilização de 40g de amostra em 160g de diluente, adequadas a matrizes não heterogéneas, mas mesmo assim era evidente depósito de leite em pó nas placas como é possível notar nas Figuras 19 e 20 inseridas na metodologia. Além disso, nem sempre as quantidades de amostra fornecidas pelo cliente permitiriam tal ajuste.

Outro fator limitante consistiu no facto de a metodologia sugerir que todas as colónias presentes em placa – além das típicas de 2-5 mm com halo a contrastar com meio púrpura – deveriam ser contadas. Em muitos testes de enumeração de esporos no leite em pó, há um número significativo de placas em que as colónias se dispersam e expandem de tal maneira que a sua contagem se torna muito difícil ou mesmo impossível.(22)

A comparação de resultados em placa deste método com outro executado em laboratório nas mesmas condições de incubação, estão representadas pela Figura 22.

Apesar de algumas recomendações de métodos laboratoriais, é muito difícil obter uma contagem exata de esporos, devido à variabilidade natural inerente aos esporos e metodologia. (22)



Para melhorar o método, seria importante aumentar a amplitude de dados, e repetir o método variando etapas do processo. Garantir as condições de execução ideais como um banho para choque térmico maior e isolamento adequado, poderiam aumentar a confiabilidade e rapidez do método.

O método de contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C demonstrou elevado nível de desempenho analítico, comprovando-se apropriado para monitorização microbiológica de leite em pó e alinhado com os requisitos de acreditação ISO 17025/11133. Esses achados sustentam a implementação do protocolo como ferramenta de rotina em laboratórios de controlo de qualidade da indústria de laticínios.



5. Conclusão

O estágio realizado no Laboratório de Microbiologia da Silliker permitiu contactar com a realidade quotidiana de um laboratório de microbiologia de grande dimensão que faz predominantemente análises de alimentos e águas. Permitiu adquirir e aprofundar conhecimentos e competências, contribuindo para o enriquecimento profissional e pessoal.

O estudo desenvolvido, contribui para consolidar práticas laboratoriais e em contexto industrial. Este tipo de estudos são muito importantes por diversos motivos, nomeadamente na garantia da segurança alimentar, garantia da qualidade do leite em pó e todos os processos a ele associados.

Para tornar o método ainda mais preciso e fiável, aperfeiçoamentos devem ser tidos em conta na execução do mesmo, bem como comparação através de ensaios interlaboratoriais para perceber a sua exatidão ou confirmação das suas colónias típicas recorrendo, por exemplo, a técnicas moleculares.

Participar numa validação de métodos como esta, permite o aumento de competências técnicas, experiência prática, conhecimento de normas e documentação científica bem como a capacidade de tomada de decisão.

Na validação do método proposto, conclui-se assim que o mesmo é válido e possível de executar, pois oferece vantagens na deteção de esporos com maior resistência de temperatura, como o caso do *G. stearothermophilus*, muito propício de se encontrar em amostras de leite em pó.



Anexo 1

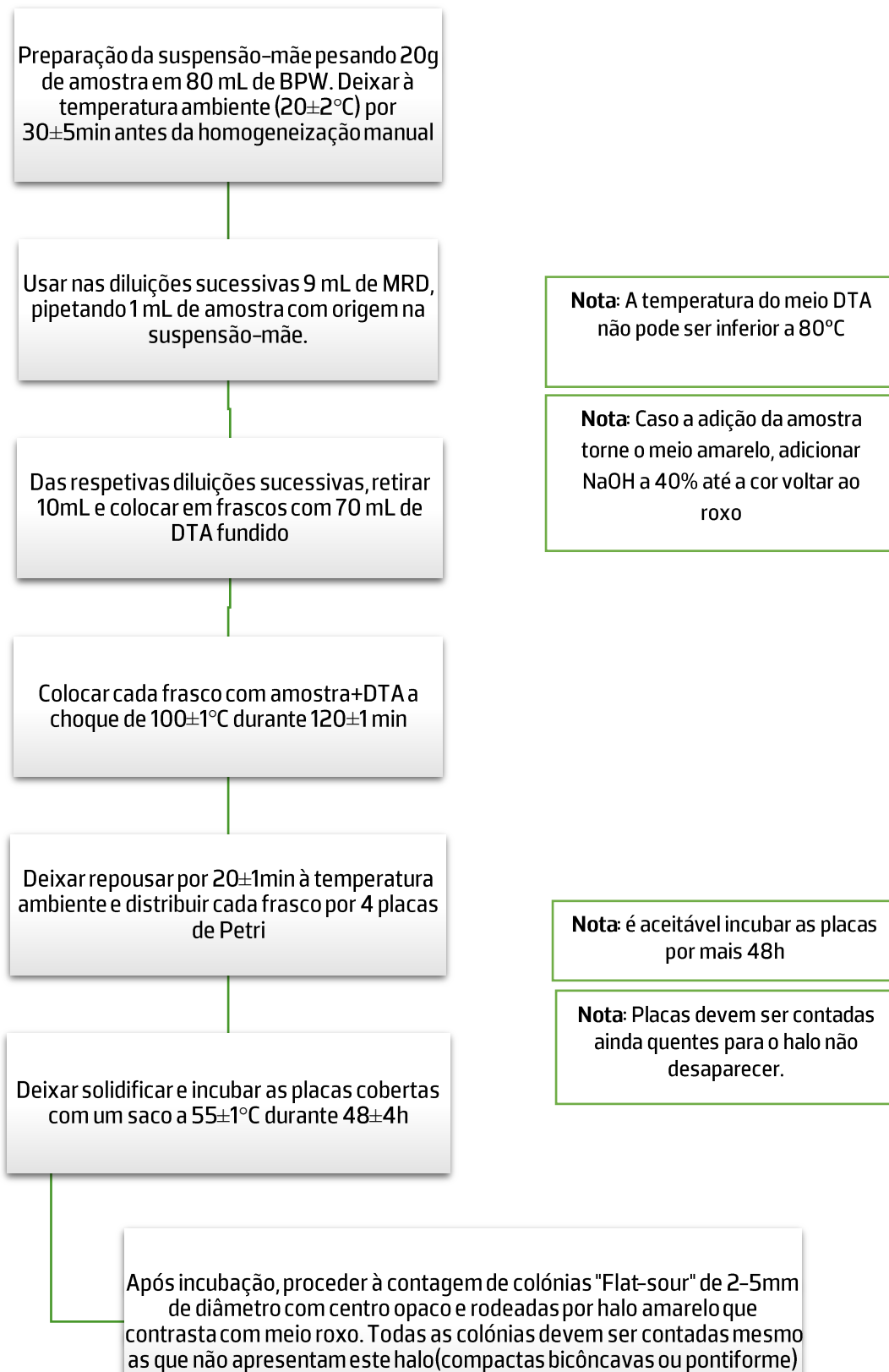


Figura 23 - Fluxograma Contagem de Esporos Aeróbios Termófilos a 55°C no Leite em Pó



Anexo 2

Tabela 13 – Compilação dos resultados da análise de amostras de leite em pó para o método de contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C (continuação páginas seguintes)

Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Nº colónias (c1)	Fator diluição (d1)	Nº colónias (c2)	Fator diluição (d2)	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)
29/11/2025	8099087	CM	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
18/12/2025	8170170	JM	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
		EP			0	2	0	3	0	0
05/03/2025	8423256	DS	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
		SM			0	2	0	3	0	0
18/03/2025	8423100	BR	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	92	2	30	3	122	610
		BR			122	2	24	3	146	730
25/03/2025	8353282	JV	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	15	2	4	3	19	95
25/03/2025	8353280	JM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	24	2	3	3	27	135
25/03/2025	8353359	EM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	15	2	3	3	18	90
25/03/2025	8364036	EP	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
		CM			0	2	0	3	0	0
25/03/2025	8353239	PS	Leite em pó	Contaminação natural	4	2	2	3	6	30
25/03/2025	8478460	SP	Leite em pó	Contaminação natural	9	2	9	3	18	90
25/03/2025	8478721	CM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	43	2	16	3	59	295
		CM			23	2	13	3	36	180
		EP			19	2	18	3	37	185
26/03/2025	8423244	DS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	78	2	30	3	108	540
		DS			143	2	37	3	180	900



Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Nº colónias (c1)	Fator diluição (d1)	Nº colónias (c2)	Fator diluição (d2)	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)
28/03/2025	8560349	EP	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	29	2	27	3	56	280
		EP			56	2	44	3	100	500
		JV			54	2	52	3	106	530
		BR			50	2	49	3	99	495
02/04/2025	8577898	MC	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
		SS			0	2	0	3	0	0
		SP			0	2	0	3	0	0
04/04/2025	8594741	JF	Leite em pó	Contaminação natural	4	2	0	3	4	20
		FS			3	2	0	3	3	15
04/04/2025	8594730	EM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	288	2	42	3	330	1650
		EM			298	2	94	3	392	1960
08/04/2025	8595201	FS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	177	2	64	3	241	1205
		JM			301	2	136	3	437	2185
		MC			204	2	133	3	337	1685
		MC			173	2	50	3	223	1115
08/04/2025	8594743	SS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	298	2	30	3	328	1640
		PS			287	2	40	3	327	1635
		PS			238	2	25	3	263	1315
		SS			291	2	37	3	328	1640
11/04/2025	8621121	JM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	63	2	6	3	69	345
		DS			64	2	5	3	69	345
		CM			57	2	10	3	67	335
11/04/2025	8621106	SM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	33	2	5	3	38	190
		FS			43	2	6	3	49	245
		PC			35	2	8	3	43	215



Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Nº colónias (c1)	Fator diluição (d1)	Nº colónias (c2)	Fator diluição (d2)	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)
15/04/2025	8627475	DS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	99	2	8	3	107	535
		FS			64	2	6	3	70	350
		PC			67	2	7	3	74	370
		EP			36	2	9	3	45	225
15/04/2025	8542311	DS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	105	2	10	3	115	575
		BR			61	2	8	3	69	345
		CM			32	2	5	3	37	185
15/04/2025	8627460	FS	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	62	2	10	3	72	360
		FS			81	2	12	3	93	465
24/04/2025	8668298	SM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	263	2	29	3	292	1460
		SM			297	2	31	3	328	1640
		PP			173	2	22	3	195	975
		JF			133	2	19	3	152	760
29/04/2025	8542380	JM	Leite em pó	Contaminado com <i>Escherichia Coli</i>	0	2	0	3	0	0
		SS			0	2	0	3	0	0
30/04/2025	8627468	PP	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	98	2	17	3	115	575
		PP			175	2	19	3	194	970
		SM			132	2	10	3	142	710
		JF			103	2	12	3	115	575
30/04/2025	8627464	SP	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	177	2	25	3	202	1010
		SP			181	2	26	3	207	1035
		SS			184	2	17	3	201	1005
02/05/2025	8716016	MC	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	290	2	24	3	314	1570
02/05/2025	8715983	JF	Leite em pó		295	2	76	3	371	1855



Data	Nº amostra	Analista	Produto	Observações	Nº colónias (c1)	Fator diluição (d1)	Nº colónias (c2)	Fator diluição (d2)	Resultado (UFC/2g)	Resultado (UFC/10g)
		JF		Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	180	2	30	3	210	1050
06/05/2025	8716145	JV	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	244	2	47	3	291	1455
		JV			212	2	41	3	253	1265
06/05/2025	8716235	MC	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	184	2	21	3	205	1025
		PC			190	2	23	3	213	1065
		PC			191	2	24	3	215	1075
06/05/2025	8716237	JM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	244	2	46	3	290	1450
		JM			248	2	31	3	279	1395
09/05/2025	8731088	BR	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
09/05/2025	8731095	SM	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
09/05/2025	8731100	JV	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
09/05/2025	8731104	EM	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
09/05/2025	8731110	EP	Leite em pó	Sem contaminação	0	2	0	3	0	0
09/05/2025	8730903	JM	Leite em pó	Contaminado com <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	208	2	21	3	229	1145



Anexo 3

Data	Amostra	Analista	Duplicados		Logaritmos		Amplitudes
			D ₁	D ₂	Log _{D1}	Log _{D2}	R(Log)= Log _{D1} - Log _{D2}
18/03/2025	8423100	BR	122	146	2,09	2,16	0,078
25/03/2025	8478721	CM	59	36	1,77	1,56	0,215
26/03/2025	8423244	DS	108	180	2,03	2,26	0,222
28/03/2025	8560349	EP	56	100	1,75	2,00	0,252
04/04/2025	8594730	EM	330	392	2,52	2,59	0,075
08/04/2025	8595201	MC	337	223	2,53	2,35	0,179
08/04/2025	8594743	PS	327	263	2,51	2,42	0,095
08/04/2025	8594743	SS	328	328	2,52	2,52	0,000
15/04/2025	8627460	FS	72	93	1,86	1,97	0,111
24/04/2025	8668298	SM	292	398	2,47	2,60	0,135
30/04/2025	8627468	PP	115	194	2,06	2,29	0,227
30/04/2025	8627464	SP	202	207	2,31	2,32	0,011
02/05/2025	8715983	JF	371	210	2,57	2,32	0,247
06/05/2025	8716145	JV	291	253	2,46	2,40	0,061
06/05/2025	8716235	PC	213	215	2,33	2,33	0,004
06/05/2025	8716237	JM	290	279	2,46	2,45	0,017
08/04/2025	8594743	SS	328	328	2,52	2,52	0,000

Figura 23 - Tabela de resultados de análises em duplicado de amostras de leite em pó, para gerar carta de duplicados permitindo o cálculo do desvio-padrão, ou seja, gerar o cálculo de precisão $IQ.178.5^a$ – Cartas de duplicados – Amplitudes



Anexo 4

Data	Nº Amostra	Analista A	C1	C2	d1	Média ponderada (ISO 7218)	Analista B	C1	C2	d1	Média ponderada (ISO 7218)	LogD1	LogD2	LogD1-LogD2	(LogD1-LogD2) ²	Soma	Variância
25/03/2025	8478721	CM	23	13	2	16	EP	19	18	2	17	1,214	1,2258	-0,0119	0,0001	0,1195	7,08E-05
28/03/2025	8560349	JV	54	52	2	48	BR	50	49	2	45	1,683	1,6532	0,0297	0,0009		4,40E-04
28/03/2025	8560349	JV	54	582	2	289	EP	29	27	2	25	2,461	1,4058	1,0553	1,1136		5,57E-01
28/03/2025	8560349	BR	50	49	2	45	EP	56	44	2	45	1,653	1,6576	-0,0044	0,0000		9,53E-06
08/04/2025	8595201	FS	177	64	2	110	JM	301	136	2	199	2,040	2,2981	-0,2585	0,0668		3,34E-02
08/04/2025	8595201	MC	204	133	2	153	JM	301	136	2	199	2,185	2,2981	-0,1129	0,0127		6,37E-03
08/04/2025	8595201	MC	173	50	2	101	FS	177	64	2	110	2,006	2,0396	-0,0337	0,0011		5,68E-04
08/04/2025	8594743	SS	291	37	2	149	PS	287	40	2	149	2,173	2,1721	0,0013	0,0000		8,79E-07
11/04/2025	8621121	JM	63	6	2	31	DS	64	5	2	31	1,496	1,4964	0,0000	0,0000		0,00E+00
11/04/2025	8621121	DS	64	5	2	31	CM	57	10	2	30	1,496	1,4837	0,0128	0,0002		8,16E-05
11/04/2025	8621106	SM	33	5	2	17	FS	43	6	2	22	1,237	1,3478	-0,1104	0,0122	0,1195	6,10E-03
11/04/2025	8621106	PC	35	8	2	20	FS	43	6	2	22	1,291	1,3478	-0,0567	0,0032		1,61E-03
11/04/2025	8621106	PC	35	8	2	20	SM	33	5	2	17	1,291	1,2374	0,0537	0,0029		1,44E-03
15/04/2025	8627475	FS	64	6	2	32	DS	99	8	2	49	1,503	1,6870	-0,1843	0,0340		1,70E-02
15/04/2025	8627475	EP	36	9	2	20	FS	64	6	2	32	1,311	1,5027	-0,1919	0,0368		1,84E-02
15/04/2025	8627475	DS	99	8	2	49	EP	36	9	2	20	1,687	1,3108	0,3762	0,1415		7,08E-02
15/04/2025	8627475	EP	36	9	2	20	PC	67	7	2	34	1,311	1,5268	-0,2160	0,0467		2,33E-02
15/04/2025	8542311	BR	61	8	2	31	DS	105	10	2	52	1,496	1,7183	-0,2218	0,0492		2,46E-02
15/04/2025	8542311	BR	61	8	2	31	CM	32	5	2	17	1,496	1,2258	0,2706	0,0732		3,66E-02
24/04/2025	8668298	SM	263	29	2	133	PP	173	22	2	89	2,123	1,9476	0,1753	0,0307		1,54E-02
24/04/2025	8668298	SM	297	31	2	149	JF	133	19	2	69	2,173	1,8394	0,3340	0,1116	5,58E-02	
24/04/2025	8668298	PP	173	22	2	89	JF	133	19	2	69	1,948	1,8394	0,1082	0,0117	5,85E-03	
30/04/2025	8627464	SP	177	25	2	92	SS	184	17	2	91	1,963	1,9608	0,0022	0,0000	2,32E-06	

Figura 24- Tabela com compilação de amostras realizadas em paralelo, permitindo o cálculo da incerteza do método. IQ.334.0 – Cálculo da incerteza da medição – Microbiologia – Alimentar



Referências Bibliográficas

1. Mérieux NutriSciences. Mérieux NutriSciences. 2025 [cited 2025 Sep 27]. Quem somos (Internet). Available from: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/quem-somos/>
2. Silliker Portugal S.A. PGQ.01 – Plano de formação inicial (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia;
3. Mérieux NutriSciences. Mérieux NutriSciences. 2025 [cited 2025 Sep 27]. Validação de métodos analíticos (Internet). Available from: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/validacao-de-metodos-analiticos/>
4. Laboratório de Microbiologia Silliker S.A. PGL.14 – Boas Práticas Laboratoriais (Documento interno). V.N. Gaia; 2021 Nov.
5. Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal S.A. PCQ.13 – Meios de cultura. Controlo da Qualidade (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2022 Jan.
6. Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal S.A. PAM.001 – Preparação de amostras (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2021 Apr.
7. Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal S.A. PCQ.25 – Controlo da qualidade em Microbiologia (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2023 Mar.
8. Laboratório de Microbiologia (Sala águas) da Silliker Portugal S.A. IQ.213.0 – Fluxograma anexo à ISO 11731:2017. Water quality. Enumeration of Legionella (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2024 Jan.
9. LabExpert – Análises de águas e Alimentos. LabExpert. 2025 [cited 2025 Sep 27]. Águas de Processo (Internet). Available from: <https://www.labexpert.pt/portfolio-2/aguas-de-processo>
10. Stott KV, Morgan L, Shearer C, Steadham MB, Ballarotto M, Hendrickson R. Qualification of Membrane Filtration for Planetary Protection Flight Implementation. *Front Microbiol.* 2022 Apr 29;13.
11. Laboratório de Microbiologia (Sala das águas) da Silliker Portugal S.A. IQ.213.0 – Fluxograma anexo à ISO 6222:1999 – Contagem de Microrganismos a 22°C e 36°C (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2018 Apr.
12. Laboratório de Microbiologia (Sala das águas) da Silliker Portugal S.A. IQ.213.0 – Fluxograma anexo à ISO 6461-2:1986 Contagem de Esporos Clostrídios Sulfito Redutores (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2017 Aug.



13. ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. ASAE. 2025 [cited 2025 Sep 27]. Perigos de Origem Alimentar (Internet). Available from: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>
14. Mello CS, Barros KV, de Moraes MB. Alimentação do lactente e do pré-escolar brasileiro: revisão da literatura. Vol. 92, *Jornal de Pediatria*. Elsevier Editora Ltda; 2016. p. 451–63.
15. ScienceDirect Tropics. Dried Milk (Internet). Elsevier [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 27]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/food-science/dried-milk>
16. Roberts D, Greenwood M. *Practical Food Microbiology*. 3th ed. Roberts D, Greenwood M, editors. Blackwell Publishing Ltd; 2003.
17. Carlin F. Origin of bacterial spores contaminating foods. Vol. 28, *Food Microbiology*. 2011. p. 177–82.
18. Watterson MJ, Kent DJ, Boor KJ, Wiedmann M, Martin NH. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *J Dairy Sci*. 2014;97(4):2487–97.
19. Gauvry E, Mathot AG, Leguériel I, Couvert O, Postollec F, Broussolle V, et al. Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Res Microbiol*. 2017 May 1;168(4):369–78.
20. Karl E. Olson, Kent M. Sorrells. Thermophilic Flat Sour Sporeformers. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods - 2015*. 5ª. Washington, DC: American Public Health Association; 2015.
21. ScienceDirect Tropics (Internet). Elsevier. 2025 [cited 2025 Sep 27]. *Geobacillus stearothermophilus*. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/geobacillus-stearothermophilus>
22. Murphy SI, Kent D, Skeens J, Wiedmann M, Martin NH. A standard set of testing methods reliably enumerates spores across commercial milk powders. *J Dairy Sci*. 2021 Mar 1;104(3):2615–31.
23. Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal S.A. PCQ.33 - Validação de métodos em análise microbiológica (Documento Interno). Canelas, V.N.Gaia; 2023 Nov.



24. Thermo Fisher Scientific. Thermo Fisher Scientific. 2025 [cited 2025 Sep 27]. Dextrose Tryptone Agar (Dehydrated) (Internet). Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/CM0075B>
25. ThermoFisher Scientific. OXOID QUALITY ASSURANCE PRODUCT SPECIFICATION DEXTROSE TRYPTONE AGAR CM0075 DEXTROSE TRYPTONE AGAR CM0075 Typical Formula*.
26. Scientific Services. P-01-01-M-MET - Preparation of Samples for Analysis (Documento Interno). 2021 Mar.
27. ISO 7218. Microbiology of the food chain – General requirements and guidance for microbiological examinations. Geneva; 2024.
28. Scientific Services. T-02-01-M-MET - Thermophilic Aerobic spore count (Documento Interno). 2020 Sep.
29. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. 2009.
30. RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia RELACRE 13 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA. Lisboa;
31. Laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal S.A. VM. - Contagem de esporos aeróbios termófilos a 55°C no leite em pó. Canelas, V.N.Gaia; 2025.
32. RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia RELACRE 3 VALIDAÇÃO DE RESULTADOS EM LABORATÓRIOS QUÍMICOS. Lisboa;
33. Monaghan TF, Rahman SN, Agudelo CW, Wein AJ, Lazar JM, Everaert K, et al. Foundational statistical principles in medical research: Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. Vol. 57, Medicina (Lithuania). MDPI AG; 2021.
34. West R, Kobokovich A. Factsheet: Understanding the Accuracy of Diagnostic and Serology Tests: Sensitivity and Specificity. 2020.
35. Downes FP, Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downes FP, Ito K, editors. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA); 2001. 676.
36. ISO - International Organization for Standardization. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the



- validation of alternative (proprietary) methods against a reference method [Internet]. 2016 Jun. Available from: www.iso.org/technical-standards/iso-11731-1
37. A. Rueckert, R.S. Ronimus, H.W. Morgan. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *J Appl Microbiol*. 2005 Nov 1;99:1246–55.
 38. Kent DJ, Chauhan K, Boor KJ, Wiedmann M, Martin NH. Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. *J Dairy Sci*. 2016 Jul 1;99(7):5180–91.
 39. Scheldeman P, Herman L, Foster S, Heyndrickx M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2006. p. 542–55.
 40. Sadiq FA, Li Y, Liu TJ, Flint S, Zhang G, Yuan L, et al. The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int J Food Microbiol*. 2016 Dec 5;238:193–201.
 41. Giambra IJ, Jahan Y, Yin T, Engel P, Weimann C, Brügemann K, et al. Identification of thermophilic aerobic sporeformers in bedding material of compost-bedded dairy cows using microbial and molecular methods. *Animals*. 2021 Oct 1;11(10).
 42. Stier P, Kulozik U. Submerged bioreactor production of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores for use as bioindicators to validate hydrogen peroxide inactivation processes. *Methods Protoc*. 2021 Sep 1;4(3).

P. PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA – RAMO MICROBIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA