

## Deteção de Contaminação Microbiana numa Bebida Aromatizada de Substituição de Refeição à Base de Soja através do Sistema Innovate™

### Introdução

O processamento asséptico é um método amplamente usado em aplicações de comida e bebida. Utiliza temperaturas ultra-altas para maximizar a esterilidade de produtos de longa duração que não requerem refrigeração. Não obstante, pode ainda ocorrer contaminação durante o fabrico e a produção.

Para minimizar o risco, é vital testar se o produto final tem contaminação por micro-organismos. O Sistema de Deteção Microbiana Rápida Innovate™ está concebido para a rápida deteção de micro-organismos numa série de produtos. Para detetar níveis muito baixos de contaminantes nesses tipos de produtos, é necessária uma etapa de enriquecimento para garantir que há ATP suficiente presente para deteção. Normalmente, um produto é incubado na sua própria embalagem para enriquecer o ATP de qualquer célula microbiana contaminante. São usadas referências pré-estabelecidas obtidas a partir de produtos não contaminados para determinar resultados positivos.

### Objetivo

O objetivo deste estudo é validar o Sistema Innovate, utilizando o Kit Láctico RapiScreen™ para a deteção do crescimento de micro-organismos numa bebida aromatizada de substituição de refeição à base de soja para demonstrar equivalência às técnicas tradicionais de placas.

### Equipamento, Materiais e Reagentes

- Ansas de inoculação estéreis
- Pipetas e pontas estéreis
- Incubadoras com capacidade para  $35 \pm 2$  °C
- Toalhitas de álcool
- Kit Láctico RapiScreen (inclui reagentes, polipropileno (PP) frascos, placas de microtitulação)
- Placas Ágar Dextrose de Sabouraud (SDA, na sigla em inglês)
- Caldo Dextrose de Batata (PDB, na sigla em inglês)
- Placas de Ágar Triptona de Soja (TSA, em inglês)
- Caldo Triptona de Soja (TSB, em inglês)
- Medidor de pH e elétrodos (i.e., sensores Mettler-Toledo InLab®)
- Sistema de Bolsa de Geração de Gás Anaeróbio EZ com Indicador GasPak™
- Seringas, 1 mL e 3 mL
- Tampão fosfato-salino Dulbecco - DPBS (sigla em inglês) (1X)
- Solução de Ringer
- Cola para Calçado, Reparação Transparente para Calçado e Revestimento Protetor
- Agulhas Precision Glide, 16 medida 1 ½"
- Controlo positivo de ATP
- Instrumento Sistema Innovate

### Organismos e Produtos do Teste

- Micro-organismos testados
  - *Cronobacter sakazakii*, ATCC# 29544
  - *Bacillus cereus* endospores, ATCC# 11778
  - *Clostridium sporogenes*, vegetativa, ATCC# 7955 (PA 3679)
  - *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC# 9027
  - *Pseudomonas putida*, ATCC# 49128
  - *Staphylococcus aureus*, ATCC# 6538
- Tipos de produtos lácteos testados
  - Bebida de substituição de refeição à base de soja, aromatizad



## Métodos

### 1. Preparação de cultura

Para *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*, foram adquiridas e utilizadas para os testes suspensões de células Quanti-Cult Plus™. *Clostridium sporogenes*, vegetativa e *Pseudomonas putida* foram preparadas com culturas Culti-Loop® (preparadas pela Thermo Fisher Scientific e fornecidas por um laboratório de terceiros). A reidratação e inoculação de todos os micro-organismos foram feitas de acordo com as instruções do fabricante.

Houve a preparação de *Pseudomonas putida* e *Clostridium sporogenes* por meio da inoculação de um Culti-Loop de carvão ativado em 5 mL de TSB. Os caldos foram então incubados a 37 °C durante 24 horas. Um conjunto de diluição em série de dez vezes foi feito com a Solução de Ringer, e foram preparadas contagens de placas em placas TSA para encontrar uma concentração <100 UFC. Utilizou-se um sistema GasPak para placas vegetativas de *Clostridium sporogenes* para incubação, com o fim de garantir o crescimento. O inóculo efetivo para o organismo utilizado durante a inserção da amostra foi determinado com o seu plaqueamento em duplicado em placas TSA. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, e foram contadas após 24 horas.

A suspensão do endósporo *Bacillus cereus* foi preparada, adicionando-se um grânulo EZ-Spore™ de 10 mL de 1X DPBS para fazer uma concentração de 10<sup>3</sup> UFC/mL. Esta suspensão bacteriana de grânulo foi incubada a 37 °C durante 30 minutos, e depois completamente misturada para se obter uma solução homogênea. A suspensão de *B. cereus* foi então aquecida a 80 °C em banho-maria durante 30 minutos. A amostra foi diluída em série dez vezes em 1X DPBS estéril e as contagens de placas foram preparadas em placas TSA para encontrar uma concentração <100 UFC. A placa foi incubada a 37 °C durante 24 horas.

### 2. Avaliações de pH

Os produtos cujo pH foi avaliado foram medidos em triplicado, para garantir a precisão das medições. O medidor de pH utilizado para a medição dos produtos foi calibrado antes do uso. Isto demonstrou que não era necessário realizar testes adicionais para confirmar que o Kit Láctico RapiScreen era capaz de neutralizar suficientemente os produtos.

### 3. Determinação de Luminância de Fundo e de Base de Referência de RLU

Para determinar os níveis de referência de ATP, cada produto foi inicialmente incubado por 24 horas a 37 °C. As amostras foram totalmente misturadas e 20 mL de cada produto foram transferidos para um recipiente estéril para testes de pH e luminância de fundo/referência.

O nível de luminância de fundo de ATP de cada produto foi determinado pela execução de uma análise utilizando solução tampão ATX em vez do reagente ATX reconstituído. A análise foi então repetida através de ATX reconstituído para permitir a remoção do sinal de ATP da luminância de fundo. Estes resultados são referidos como os valores RLU de Referência. Os valores RLU de Referência devem ser baixos e consistentes, demonstrando que o sinal RLU de luminância de fundo desapareceu totalmente. Um valor de RLU de referência estável permite definir um limiar (positivo/negativo) de valor de corte para identificar amostras contaminadas.

- Protocolo de Referência: Dispensar 60 µL ATX – Batido 10 min – Siga as instruções do RapiScreen Láctico para detecção
- Protocolo de Luminância de Fundo: Dispensar 60 µL de tampão ATX – bater 10 min – Seguir as instruções do RapiScreen Láctico para detecção

Uma vez estabelecidas linhas de referência e preparadas culturas, cada tipo de produto foi inoculado em duplicado a <100 UFC por recipiente. Os micro-organismos foram introduzidos com uma seringa através da parte superior do recipiente e vedados com Cola para Calçado. Um recipiente não inoculado foi incubado com cada

conjunto inoculado para controlo negativo. Os controlos positivos foram estabelecidos por meio da inoculação de TSB ou PDB com 100 µl da cultura <100 UFC.

As amostras foram incubadas a 35 ± 2 °C por até sete dias. Nos dias 1 a 7, foram retiradas alíquotas de cada recipiente e testadas no Sistema Innovate através do Kit Láctico RapiScreen. Paralelamente, cada 50 µL de cada amostra de produto foram inoculados em placas de TSA e incubados durante 24 horas a 35± 2 °C para crescimento e confirmação de morfologia. As Bolsas de Geração de Gás Anaeróbio GasPak EZ foram usadas para incubar placas de confirmação com riscado de *C. sporogenes* para permitir que o organismo efetivamente cresça se presente. O crescimento observado em placas de confirmação correspondeu à morfologia do micro-organismo usado para inocular.

### Resultados

Para o produto inicial, não inoculado, os testes não demonstraram propriedades incomuns que possam interferir no estudo (ver Tabela 1, a, b, c). O pH do produto foi neutro como esperado para estas bebidas, e não se observou qualquer crescimento em amostras de plaqueamento. Além disso, a luminância de fundo foi baixa (395) e consistente em 32 testes individuais (faixa de 357 a 481 RLU). Quando o teste de referência foi realizado, os resultados RLU foram ainda menores, e de novo consistentes, com uma média de 11 RLU. Como resultado, o limite foi definido em 32.

Nos testes de produtos inoculados, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* e *P. putida* foram todas elas detetadas no Sistema Innovate em 24 horas após a inoculação (Tabelas 2 e 3). *B. cereus*, *C. sporogenes* e *S. aureus* foram detetadas após 48 horas. Os valores de RLU foram recolhidos apenas para os Dias 1 a 4 para *C. Sakazakii* e *C. sporogenes*, devido ao crescimento excessivo deste produto e à produção excessiva de gás, que causa a fuga, nos recipientes, do produto. Todos os resultados positivos sobre o Sistema Innovate foram confirmados através da disposição em riscado de produtos em TSA. Mostra-se um resumo dos resultados na Tabela 3.

**Tabela 1.** Avaliações de Produto – pH, Luminância de Fundo, Base de Referência e Esterilidade

a) pH

pH Amostra de Produto			
Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média
7,13	7,12	7,12	7,12

b) Leituras da Luminância de Fundo e Base de Referência

Média RLU (n=32)		
Luminância de Fundo	Base de Referência	Limite
395	11	32

c) Confirmação de Esterilidade

Placas de Esterilidade	
TSA	SDA
Sem Crescimento	Sem Crescimento



**Tabela 2.** Detecção de Crescimento de Micro-organismos ao Longo do Tempo no Produto Aromatizado de Substituição de Refeição à Base de Soja

\*Fuga – A produção de gás do organismo fez com que o recipiente do produto rebentasse ou ficasse com uma fuga.

Luminância de Fundo do Produto: 395 RLU		Base de Referência do Produto: 11 RLU		Limite: 32 RLU						
Organismo	Inoculação Alvo	Inoculação Real	Confirmação Resultado de Placa	Dias: Valor RLU (Média)						
	Células ou *Esporos (UFC)	Células ou *Esporos (UFC)		1	2	3	4	5	6	7
<i>Endósporos bacillus cereus</i>	<100	28	Crescimento	10	70	33 144	1068	2489	2782	1460
<i>Clostridium sporogenes</i> vegetativa	<100	20	Crescimento	18	52 063	89 495	85 773	FUGA	FUGA	FUGA
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<100	92	Crescimento	39 812	56 762	60 615	14 594	FUGA	FUGA	FUGA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<100	138	Crescimento	10 141	2338	2590	877	1555	1902	1517
<i>Pseudomonas putida</i>	<100	59	Crescimento	1010	6842	5232	317	573	37 263	14 846
<i>Staphylococcus aureus</i>	<100	35	Crescimento	9	461	7056	892	6821	20 111	9441
<b>Painel em Branco</b>	<b>Inoculação Alvo</b>	<b>Inoculação Real</b>	<b>Confirmação Resultado de Placa</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<i>Controlo Negativo</i>	0	0	Sem Crescimento	8	12	9	12	8	12	28

**Tabela 3.** Resumo do Tempo de Detecção do Crescimento de Micro-organismo no Produto de Substituição de Refeição

Tempo de Detecção do Produto com o Sistema Innovate					
<i>B. cereus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>
48 horas	48 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas

**Conclusões:**

O produto aromatizado de substituição de refeição à base de soja foi inoculado com um alvo <100 UFC e incubado a 35 ± 2 °C, com leituras realizadas nos dias 1 a 7. Os níveis de UFC apurados foram de 28, 20, 92, 138, 59 e 35 para os organismos *B. cereus*, *C. sporogenes*, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *P. putida* e *S. aureus*, respetivamente.

Como se mostra nas tabelas acima (Tabelas 2 e 3), *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* e *P. putida* foram todas detetadas no Sistema Innovate dentro de 24 horas após a inoculação. *B. cereus*, *C. sporogenes* e *S. aureus* foram detetadas após 48 horas. Os valores de RLU para *C. sakazakii* e *C. sporogenes* só puderam ser obtidos nos Dias 1 a 4, devido ao crescimento excessivo do produto e à produção excessiva de gás, que causaram fugas nos recipientes do produto. Todos os resultados positivos sobre o Sistema Innovate foram confirmados através da disposição em riscado de produtos em TSA.



## Sumário

O processamento asséptico de produtos à base de soja pode ajudar a reduzir o risco de contaminação microbiana dos produtos. Isto é claramente mostrado nos baixos valores de referência para deteção de ATP em amostras não inoculadas. Além disso, os valores de RLU de referência foram consistentemente estáveis, permitindo o estabelecimento de um valor limite positivo/negativo. O limite para este produto foi fixado em 32 RLU. Os valores RLU acima deste limiar indicaram um resultado positivo.

O sinal do crescimento de todas as culturas de organismos testadas neste produto demonstrou que a relação sinal-ruído não era um problema. Mesmo quando inoculadas com baixos níveis de micro-organismos (<100 UFC), as amostras testadas produziram RLU muito altas em 24 a 48 horas, validando assim que o Sistema Innovate seria uma ferramenta útil na deteção de contaminação microbiana de produtos aromatizados de substituição de refeição à base de soja.

Com base nestes resultados, a Hygiena<sup>®</sup> recomenda o uso do Sistema Innovate para a deteção de baixos níveis de contaminação microbiana em produtos de substituição de refeição à base de soja.