

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UNUT.017 – Página 1/5	
Título do Documento	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	Emissão: 07/01/2025	Próxima revisão: 07/01/2027
		Versão: 04	

1. OBJETIVO

Realizar o teste microbiológico simplificado e a confirmação da presença de coliformes totais no leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP), garantindo sua qualidade e segurança para consumo.

2. SIGLAS E CONCEITOS

- LHOP: leite humano ordenhado pasteurizado,
- BGBL: caldo bile verde brilhante,
- Coliformes totais: bacilos gram-negativos que fermentam lactose e indicam possível contaminação.

3. DEFINIÇÕES

Consiste em identificar microrganismos indesejáveis para o leite.

4. RESPONSABILIDADES

Farmacêutico ou Nutricionista com Curso de Aperfeiçoamento em Processamento e Controle de Qualidade do Leite Humano, oferecido pela Fiocruz.

5. MATERIAIS

- Estufa bacteriológica;
- Autoclave;
- Pipeta automática e ponteiros descartáveis (1mL);
- Balança analítica calibrada;
- Alça bacteriológica descartável (10µL);
- Cabine de segurança biológica;
- Tubos de Durham;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UNUT.017 – Página 2/5	
Título do Documento	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	Emissão: 07/01/2025	Próxima revisão: 07/01/2027
		Versão: 04	

- Estante para suporte (revestida em plástico PVC);
- Tubos de cultura com tampa rosqueável;
- BGBL 5% e 4%;
- Planilha de Controle de Estoque;
- Classificação e Resultado da Análise Microbiológica; e
- Formulário de Controle de Temperatura da Estufa Microbiológica.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

1. Estar devidamente paramentado, conforme o POP. UNUT.051 - Higiene e paramentação de colaboradores.
2. Monitorar e registrar a temperatura da estufa bacteriológica no início e no fim dos procedimentos (Anexo I).
3. Preparar o meio de cultura BGBL 5% e 4%:
 - Pesar o meio de cultura em balança analítica: 50 g/L para BGBL 5% ou 40 g/L para BGBL 4%.
 - Medir 1 L de água destilada em proveta e aquecer levemente.
 - Adicionar 200mL de água destilada para dissolução do meio de cultura e misturar com auxílio de uma espátula, em seguida, adicionar pouco a pouco o volume restante de água destilada para sua completa dissolução.
 - Distribuir 10 mL (5%) ou 9 mL (4%) do meio de cultura previamente preparado em tubos de vidro com tampa rosqueável, apropriados para cultura microbiológica e com capacidade mínima de 15 mL, assegurando que os tubos de Durham estejam previamente invertidos em seu interior.
 - Identificar o lote de produção do meio de cultura com o nome do meio, concentração e data de preparo.
 - Fechar os tubos deixando suas tampas a ¼ de volta e esterilizar a 121°C por 15 minutos em autoclave.
 - Abrir a válvula de escape da autoclave somente após o esfriamento total do equipamento, impedindo a formação de microbolhas no interior dos tubos de Durham.
 - Retirar os tubos da autoclave, verificar se houve formação de microbolhas e fechá-los.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UNUT.017 – Página 3/5	
Título do Documento	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	Emissão: 07/01/2025	Próxima revisão: 07/01/2027
		Versão: 04	

- Validar o teste de esterilidade incubando no mínimo 10% dos tubos do lote do meio de cultura em estufa a 36°C (± 1°C) por 24h. A formação de gás ou turvação do meio em um único tubo desqualifica todo o lote produzido.
 - Armazenar sob refrigeração a 5°C por no máximo 15 dias.
4. Coletar as amostras:
- Retirar os tubos contendo o meio de cultura do refrigerador e deixá-los em temperatura ambiente até atingirem o equilíbrio térmico.
 - Certificar-se, antes do uso, de que os tubos de Durham estejam completamente imersos no meio de cultura, sem a presença de bolhas de ar ou depósitos de cristais em seu interior.
 - Identificar os tubos de acordo com os frascos que serão analisados com auxílio de caneta específica para vidros.
 - Coletar, em cabine de segurança biológica, quatro alíquotas de 1 mL da amostra a ser analisada, garantindo que sejam retiradas de diferentes pontos do frasco. Transferir todas as alíquotas de uma mesma amostra para um único tubo de cultura contendo BGBL concentrado (5%) e fechá-los.
5. Teste presuntivo:
- Incubar os tubos em estufa bacteriológica a 36 ± 1°C por um período de 24 a 48 horas.
 - Verificar a formação de gás no tubo de Durham como indicação presuntiva de coliformes totais. Em caso de formação de gás, o teste deve ser obrigatoriamente submetido à prova confirmatória.
6. Prova confirmatória:
- Selecionar os tubos positivos no teste presuntivo.
 - Coletar alíquota de 10 µL do tubo com BGBL 5%, utilizando alça bacteriológica.
 - Inocular no meio BGBL 4% e incubar em estufa bacteriológica a 36 ± 1°C por 24 a 48 horas.
 - Confirmar a presença de coliformes pela formação de gás no tubo de Durham.
7. Registrar os resultados das análises microbiológicas na planilha de Controle de Estoque, Classificação e Resultado da Análise Microbiológica (Anexo 2).

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UNUT.017 – Página 4/5	
Título do Documento	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LEITE PASTEURIZADO	Emissão: 07/01/2025	Próxima revisão: 07/01/2027
		Versão: 04	

7. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 918 de 19 de setembro de 2024**. Dispõe sobre o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União nº 187, 26 set. 2024. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6875868/RDC_916_2024_.pdf/b569fe81-26b3-483c-9532-36776273d60f Acessado em: 24 de novembro de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Norma Técnica nº 40.21/2021**: Controle de qualidade microbiológico - Teste simplificado para detecção de coliformes totais. Disponível em: https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/126/nt_40_21_controle_de_qualidade_microbiologico_teste_simplificado_para_deteccao_de_coliformes_totais.pdf Acessado em: 27 novembro de 2024.

8. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
01	31/07/2017	Elaboração.
02	09/07/2018	Revisão.
03	29/09/2023	Revisão do POP e atualização do modelo de documento.
04	28/11/2024	Revisão e atualização.

Elaboração Cristiane Nava Duarte, Michele Cristina de Carvalho, Naiana Alves Cardoso, Rita de Cássia Dorácio Mendes.	Data: 31/07/2017
Revisão 2ª versão: Cristiane Nava Duarte, Rita de Cássia Dorácio Mendes. 3ª versão: Cristhiane Rossi Gemelli, Cristiane Nava Duarte. 4ª versão: Cristhiane Rossi Gemelli, Cristiane Nava Duarte, Neiva Ney Gomes Barreto.	Data: 09/07/2018 Data: 29/09/2023 Data: 28/11/2024
Análise Daniel Salas Steinbaum – Chefe da DCDDT	Data: 26/12/2024
Validação Graciela Mendonça dos Santos Bet – Chefe do Setor de Gestão da Qualidade em exercício	Data: 27/12/2024
Aprovação Érika Leite Ferraz Libório – Chefia da UNUT e RT da Nutrição Tiago Amador Correia – Gerente de Atenção à Saúde	Data: 26/12/2024 Data: 07/01/2025

Assinado eletronicamente no processo SEI 23529.019723/2024-12.

