

Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária (EP/INCQS)

**Microbiologia de Alimentos 12^a Rodada
Contagem de Bactérias Mesófilas em Água**

Rodada EP MIB 12/14



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 12ª Rodada –
Contagem de Bactérias Mesófilas em Matriz Água**

RELATÓRIO FINAL

ORGANIZAÇÃO E COORDENAÇÃO



Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS
Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos
Rio de Janeiro - RJ – Brasil - Cx. Postal 926 - CEP: 21040-900

COMISSÃO ORGANIZADORA DA RODADA

- COMISSÃO DO PROGRAMA DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Armi Wanderley da Nóbrega – Coordenador Geral
Marcus Henrique Campino de la Cruz – Coordenador Técnico
Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso – Coordenadora da Qualidade
Lilian Verdolin Milo Collor – Qualidade

- COMITÊ TÉCNICO

Carla de Oliveira Rosas
Cátia Cardoso da Silva
Luana Vilela Lopes
Marcelo Luiz Lima Brandão
Rodrigo Domingos Overa Tavares
Sílvia Maria Lopes Bricio
Valéria de Mello Medeiros

Autorizada a emissão – Armi W. da Nóbrega
(Coordenador Geral)

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Objetivos	3
3. Produção e Análise dos Itens de Ensaio	4
3.1. Escolha da Matriz	4
3.2. Preparo do Item de Ensaio	4
3.3. Faixa de Concentração Esperada.....	4
3.4. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio	4
3.5. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio.....	5
3.6. Recebimento do Item de Ensaio	5
3.7. Análise dos Itens de Ensaio.....	5
4. Tratamento Estatístico dos Resultados	6
4.1. Avaliação da Homogeneidade dos Itens de Ensaio	6
4.2. Avaliação da Estabilidade dos Itens de Ensaio.....	6
4.3. Estabelecimento do Valor Designado ($\bar{x}$) e suas incertezas ($u_{\bar{x}}$)	6
4.4. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência.....	7
4.5. Índice z	7
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio	7
5.1. Avaliação da Homogeneidade	7
5.2. Avaliação da Estabilidade	8
6. Atribuição do Valor Designado	10
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes	10
7.1. Laboratórios Participantes	10
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes.....	10
7.3. Cálculo do Índice z	13
8. Conclusões e Comentários.....	15
9. Confidencialidade	15
10. Referências Bibliográficas	16
11. Relação de Laboratórios Participantes.....	17
Anexo A – Homogeneidade Segundo o Protocolo Harmonizado	18
Anexo B – Valor Designado Segundo a Norma ISO 13528	20

1. Introdução

Ensaio de proficiência (EP) é o uso de comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio ou medição de modo competente e demonstrar a confiabilidade dos resultados gerados. Em um contexto geral, o ensaio de proficiência propicia aos laboratórios participantes: avaliação do desempenho e monitoração contínua; evidência de obtenção de resultados confiáveis; identificação de problemas relacionados com a sistemática de ensaios; possibilidade de tomada de ações corretivas e/ou preventivas; avaliação da eficiência de controles internos; determinação das características de desempenho e validação de métodos e tecnologias; padronização das atividades frente ao mercado e reconhecimento de resultados de ensaios, em nível nacional e internacional.

Com a crescente demanda por provas regulares e independentes de competência pelos organismos reguladores e clientes, o ensaio de proficiência é relevante para todos os laboratórios que testam a qualidade de produtos. Além do baixo número de provedores de ensaios de proficiência na área de alimentos, os custos cobrados para a participação nestes ensaios principalmente de provedores internacionais, são normalmente muito elevados, o que inviabiliza, em muitos casos, a participação de um laboratório em um número maior de ensaios.

A qualidade da água é uma das grandes preocupações da saúde pública em todo o mundo. O controle da qualidade da água e as análises laboratoriais em casos de surtos de doenças de transmissão hídrica ocorridos no território brasileiro são de responsabilidade da rede de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen). Logo, a qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados para o controle microbiológico da água nestes laboratórios são de suma importância para garantir que os produtos analisados sejam avaliados corretamente e não venham a causar danos à saúde do consumidor. Assim, a realização de programas de ensaio de proficiência no Brasil, na área de microbiologia de alimentos e de água, é fundamental para o aumento da confiabilidade dos resultados das medições realizadas, trazendo maior confiabilidade aos resultados emitidos.

Visando a promoção da saúde e em apoio a maior competitividade da indústria nacional, o INCQS promoveu o Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 12ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Matriz Água, seguindo as diretrizes da [ABNT NBR ISO/IEC 17043](#), apresentando neste relatório os resultados da avaliação de desempenho dos laboratórios participantes.

2. Objetivos

O objetivo deste Ensaio de Proficiência é fornecer aos laboratórios participantes uma ferramenta efetiva para verificar sua competência nos ensaios de quantificação microbiológica de bactérias mesófilas em matriz água, aplicando a metodologia analítica utilizada na rotina. Este EP também poderá contribuir para:

- Promover o aumento da confiança nos resultados das medições dos laboratórios participantes;
- Avaliar o desempenho de laboratórios para o ensaio proposto; e
- Propiciar subsídios aos laboratórios para a identificação e solução de problemas.

3. Produção e Análise dos Itens de Ensaio

Os procedimentos de preparo dos itens de ensaio e as análises de controle foram realizados no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz, seguindo os requisitos da norma [ABNT ISO/IEC 17025](#).

3.1. Escolha da Matriz

A água é essencial para a vida, mas pode ser veículo da transmissão de várias doenças, dependendo da qualidade microbiológica. A diarreia é a principal doença transmitida pela água, tendo ocorrência anual estimada de 4,6 bilhões de episódios, com 2,2 milhões de mortes por ano ([WHO](#), 2010).

A Portaria nº 2.914 de 12/12/2011 ([BRASIL](#), 2011) estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A mesma orienta que a contagem de bactérias heterotróficas não ultrapasse o limite de 500 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro, UFC mL⁻¹.

3.2. Preparo do Item de Ensaio

A cultura bacteriana foi preparada com cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Bacillus cereus* da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ, identificadas como P4283 e P3441, respectivamente.

O lote foi preparado a partir da homogeneização de uma suspensão de células das cepas em solução crioprotetora à uma concentração conhecida e controlada. Após a homogeneização, volumes de 1mL foram distribuídos em frascos de vidro estéreis. Posteriormente, os frascos foram congelados em *ultrafreezer* à aproximadamente -70 °C e submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas.

3.3. Faixa de Concentração Esperada

Os itens de ensaio do lote MES 01/14 apresentaram concentrações aproximadas de 2×10^4 UFC mL⁻¹.

3.4. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Vinte itens de ensaio do lote preparado foram separados, aleatoriamente, para o teste de homogeneidade. Após a reconstituição e homogeneização do líófilo, foram preparadas diluições decimais analisadas sob condições de repetitividade.

Foram realizados estudos de estabilidade de curta duração (transporte) e de longa duração (armazenamento e referência). Para os estudos de longa duração foi feito o controle de estoque a -70°C (temperatura de referência) e a -20°C (temperatura de armazenamento durante o EP). Os testes da estabilidade a -70°C e -20°C foram iniciados após o preparo do lote e abrangeram o tempo disponibilizado aos laboratórios participantes do EP para a análise do item de ensaio.

A estabilidade de curta duração, que verificou a influência da temperatura nas condições de transporte, foi estudada por 4 dias, em diferentes temperaturas: 4°C, 30°C e 35°C, utilizando-se o modelo isócrono (Lamberty, Schimmel e Pauwels, 1997).

Os testes estatísticos foram feitos segundo o [Protocolo Harmonizado](#) (Homogeneidade) e a [ISO GUIA 35](#) (Estabilidade), e os resultados obtidos nos testes estão apresentados nos itens 5.1 e 5.2 deste relatório.

3.5. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio

Os frascos foram armazenados em *ultrafreezer* (aproximadamente -70°C) até o momento em que foram enviados aos laboratórios participantes.

Para cada laboratório inscrito na 12ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Contagem de Bactérias Mesófilas em Matriz Água foi enviado 1 (um) frasco contendo micro-organismos liofilizados, lacrado, identificados com as seguintes informações: o item a ser ensaiado, o código da rodada e o número da amostra em questão. Cada frasco continha um mililitro da suspensão bacteriana.

Os frascos foram enviados aos laboratórios por via aérea. Cada frasco foi acondicionado em recipiente apropriado. Além disso, o recipiente foi colocado dentro de uma caixa de isopor contendo gelo seco, devidamente lacrada e identificada, para que a integridade do conteúdo fosse mantida durante o transporte.

Os laboratórios receberam as informações necessárias para realizar o armazenamento adequado dos itens de ensaio, através do formulário de “**Instruções para Armazenamento e Preparo dos Itens de Ensaio**”, disponibilizado no site durante o EP.

3.6. Recebimento do Item de Ensaio

Ao receber a amostra, os laboratórios foram orientados a inspecioná-la quanto à temperatura de recebimento, bem como a integridade da embalagem e da amostra. As informações foram registradas no “**Formulário de Recebimento de Item de Ensaio**”.

3.7. Análise dos Itens de Ensaio

Para as análises de controle dos itens de ensaio (teste de homogeneidade e estudo de estabilidade) foi utilizada a metodologia de plaqueamento direto, em Ágar Padrão para Contagem, segundo o Procedimento Operacional Padronizado (POP) do INCQS.

Os laboratórios participantes foram orientados a realizar as análises segundo a sua metodologia de rotina.

Os resultados analíticos, expressos em UFC mL⁻¹, bem como a metodologia de trabalho, foram encaminhados à Coordenação do Ensaio de Proficiência através do “**Formulário de Registro de Resultados**”.

4. Tratamento Estatístico dos Resultados

Neste tópico estão descritas as análises estatísticas utilizadas para a avaliação da homogeneidade e da estabilidade das amostras, para a obtenção do valor designado e sua incerteza, do desvio padrão utilizado na avaliação dos laboratórios (desvio padrão robusto), bem como para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes.

4.1. Avaliação da Homogeneidade dos Itens de Ensaio

O [Protocolo Harmonizado](#) foi seguido na avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio. Um resumo do procedimento estabelecido neste documento para avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio é apresentado no [Anexo A](#).

4.2. Avaliação da Estabilidade dos Itens de Ensaio

Esses estudos foram empregados para se avaliar a estabilidade da concentração bacteriana na matriz em função do tempo (longa duração) e do tempo-temperatura (curta duração). Assim, foram estimadas as variâncias dos valores utilizados na regressão linear, observando se os valores de contagem apresentavam alguma tendência, através da ferramenta estatística de análise de variância (ANOVA). A concentração de bactérias mesófilas foi considerada estável quando o gráfico da concentração em função do tempo não apresentou tendências e a inclinação da reta (ou a não linearidade) não foi significativa.

4.3. Estabelecimento do Valor Designado (x^*) e suas incertezas (u_{x^*})

As técnicas de estatística robusta são utilizadas para minimizar a influência de resultados extremos sobre as estimativas de média e desvio-padrão. Assim, a Coordenação deste Ensaio de Proficiência adotou como valor designado aquele oriundo do cálculo da estatística robusta apresentado no item 5.6 da norma ISO [13528](#), norma específica de métodos estatísticos para uso em EP por comparações interlaboratoriais. O procedimento adotado no cálculo do valor designado e de suas incertezas é descrito no [Anexo B](#). Seguindo os critérios desta norma, o valor designado foi obtido pela média robusta dos resultados emitidos pelos laboratórios participantes.

4.4. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência

Nesta rodada de EP o desvio padrão para avaliação de proficiência dos laboratórios participantes foi calculado como recomendado no item 6.6 da norma ISO [13528](#), isto é, a partir do desvio padrão robusto calculado a partir dos resultados dos participantes (e do INCQS), usando o algoritmo A do anexo C desta norma. O procedimento adotado no cálculo do Desvio Padrão Robusto é descrito no [Anexo B](#).

4.5. Índice z

Para a qualificação dos resultados dos laboratórios, o índice z (z-score, medida da distância relativa do resultado da medição do laboratório em relação ao valor designado do ensaio de proficiência) foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$z = \frac{x_i - x^*}{s^*} \quad (1)$$

Onde x_i representa o valor do laboratório participante, x^* representa o valor designado (média robusta) e s^* o desvio padrão de robusto.

A interpretação do valor do **índice z** está descrita abaixo:

- $|z| \leq 2$ - Resultado satisfatório
- $2 < |z| < 3$ - Resultado questionável
- $|z| \geq 3$ - Resultado insatisfatório

5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Os ensaios da avaliação da homogeneidade e do estudo da estabilidade foram realizados a partir de análises quantitativas, verificando a concentração de células diretamente do líófilo, sem a homogeneização deste com a matriz sendo os resultados expressos em UFC mL⁻¹.

5.1. Avaliação da Homogeneidade

Para o teste de homogeneidade foram separados, aleatoriamente, 20 itens de ensaio. Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises completas produzindo dois resultados (A e B), como mostrado na [Tabela 1](#).

Tabela 1: Dados gerados no teste de homogeneidade, em UFC mL⁻¹.

Item de Ensaio	Lote de Bactérias Mesófilas			
	Contagem (UFC mL ⁻¹)		Log ₁₀ (UFC mL ⁻¹)	
	A	B	A	B
1	49000	43000	4,69	4,63
2	48000	53000	4,68	4,72
3	49000	29000	4,69	4,46
4	42000	38000	4,62	4,58
5	38000	33000	4,58	4,52
6	48000	60000	4,68	4,78
7	50000	34000	4,70	4,53
8	34000	38000	4,53	4,58
9	35000	18000	4,54	4,26
10	38000	43000	4,58	4,63
11	43000	35000	4,63	4,54
12	42000	52000	4,62	4,72
13	46000	48000	4,66	4,68
14	37000	44000	4,57	4,64
15	32000	36000	4,51	4,56
16	40000	33000	4,60	4,52
17	26000	24000	4,41	4,38
18	52000	46000	4,72	4,66
19	38000	55000	4,58	4,74
20	31000	33000	4,49	4,52

A [Tabela 2](#) apresenta os resultados da análise estatística do estudo de homogeneidade.

Tabela 2: Sumário da análise estatística, em log₁₀ UFC mL⁻¹.

Lote	Média	σ_p	σ_{all}^2	S_{an}^2	S_{sam}^2	c	Resultado
Bactérias Mesófilas	4,59	0,25	0,00562	0,00629	0,00497	0,01249	Suficientemente Homogêneo

Onde: σ_p - Desvio padrão alvo; σ_{all}^2 - Variância amostral aceitável; S_{an}^2 - Variância analítica; S_{sam}^2 - Variância amostral; c – Valor crítico de homogeneidade.

5.2. Avaliação da Estabilidade

No decorrer do EP, foram avaliadas as flutuações temporais na concentração bacteriana nas temperaturas de referência (-70 °C) e de armazenamento (-20 °C) (Tabelas [3](#) e [4](#)). A influência da temperatura nas condições de transporte também foi estudada por 4 dias ([Tabela 5](#)). Estas avaliações foram realizadas utilizando-se a análise de resíduos da regressão linear.

Tabela 3: Estudo de estabilidade: Temperatura de referência (-70°C).

Dias	Item 1 (UFC mL ⁻¹)		Item 2 (UFC mL ⁻¹)		Log das Médias (Log ₁₀ UFC mL ⁻¹)
	Replicata A	Replicata B	Replicata A	Replicata B	
0	32000	28000	37000	33000	4,51
15	24000	21000	49000	41000	4,50
28	30000	25000	42000	38000	4,52
42	44000	36000	44000	40000	4,61
56	51000	41000	26000	25000	4,53
77	39000	38000	32000	26000	4,52
112	45000	50000	42000	48000	4,66

Tabela 4: Estudo de estabilidade: Temperatura de armazenamento (-20 °C).

Dias	Item 1 (UFC mL ⁻¹)		Item 2 (UFC mL ⁻¹)		Log das Médias (Log ₁₀ UFC mL ⁻¹)
	Replicata A	Replicata A	Replicata A	Replicata B	
0	35000	28000	37000	25000	4,49
7	23000	38000	46000	30000	4,52
15	51000	44000	25000	23000	4,53
21	18000	23000	23000	30000	4,36
28	44000	31000	37000	33000	4,56
35	24000	21000	49000	45000	4,51
49	50000	45000	63000	33000	4,67
63	54000	33000	53000	50000	4,67
77	32000	32000	49000	22000	4,51
105	42000	38000	45000	37000	4,61

Tabela 5: Análise de Regressão - Diferentes estudos de estabilidade, em Log₁₀ UFC mL⁻¹ dias⁻¹.

Bactérias Mesófilas	Coeficiente Angular	Erro padrão	Intervalo de confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Referência	0,00123	0,00049	-0,00002	0,00248	Estável
Armazenamento	0,00135	0,00082	-0,00055	0,00326	Estável
Transporte 4°C	-0,00085	0,02094	-0,06751	0,06580	Estável
Transporte 30°C	-0,04257	0,04099	-0,17303	0,08789	Estável
Transporte 35°C	-0,15293	0,22704	-0,87546	0,56960	Não Estável*

* apresentou tendência

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos dados gerados nos estudos de estabilidade de referência, armazenamento e de transporte a 4°C e 30°C evidenciaram que o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular abrange o valor zero (0). Conclui-se, portanto, que os itens de ensaio mostraram-se suficientemente estáveis nestas condições.

6. Atribuição do Valor Designado

O valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, bem como os laboratórios que contribuíram para este cálculo, estão apresentados na [Tabela 6](#).

Tabela 6: Valor designado (x^*), desvio padrão (s^*), incertezas do valor designado (Log_{10} UFC g^{-1}).

Lote	x^*	s^*	$s^*(\%)$	u_c	k	U	Laboratórios
Bactérias Mesófilas	3,43	0,21	6,12	0,06	2,16	0,13	Todos os laboratórios que enviaram resultado

A incerteza combinada do valor designado foi menor que $0,3s^*$. Assim, esta PODE ser negligenciada nas avaliações.

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Vinte e quatro laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 12ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Matriz Água, e dezoito (75%) deles enviaram os resultados.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, três (16,7%) são acreditados na norma [ISO/IEC 17025](#) e apenas um laboratório (5,6%) está em processo de acreditação na norma citada.

Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública, Lacen, responderam por 77,8% da participação (14 laboratórios). Somados às Vigilâncias Sanitárias municipais este percentual atinge a marca de 88,9% (16 laboratórios). Um Laboratório Nacional Agropecuário, Lanagro, e um laboratório privado completam a [lista de participantes](#).

7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Os dados reportados pelos laboratórios participantes do EP foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na [ISO/IEC 17043](#). A [Tabela 7](#) apresenta os resultados dos laboratórios para as análises dos itens de ensaio e a metodologia empregada.

O gráfico da dispersão dos resultados dos laboratórios participantes encontra-se na [Figura 1](#). No gráfico, a linha central representa o valor designado e as linhas paralelas representam o intervalo da incerteza expandida (U) do valor designado.

Tabela 7: Resultados por análise (UFC g⁻¹) e metodologia empregada.

Código dos Laboratórios	Item número	Resultado UFC g ⁻¹	Metodologia ⁽¹⁾
MIB 12/001	06	16400	Outros ⁽²⁾
MIB 12/007	17	2520	APHA
MIB 12/015	11	1155	APHA
MIB 12/019	13	2375	APHA
MIB 12/054	04	1700	APHA
MIB 12/067	30	2800	APHA
MIB 12/093	20	238	APHA
MIB 12/099	03	2112	APHA
MIB 12/115	08	2400	APHA
MIB 12/160	29	2100	APHA
MIB 12/241	21	3400	Outros ⁽²⁾
MIB 12/245	01	6000	Outros ⁽²⁾
MIB 12/246	05	5400	APHA
MIB 12/254	33	2570	APHA
MIB 12/279	12	3900	APHA
MIB 12/294	28	3100	APHA
MIB 12/299	19	1900	APHA
MIB 12/300	18	8500	APHA

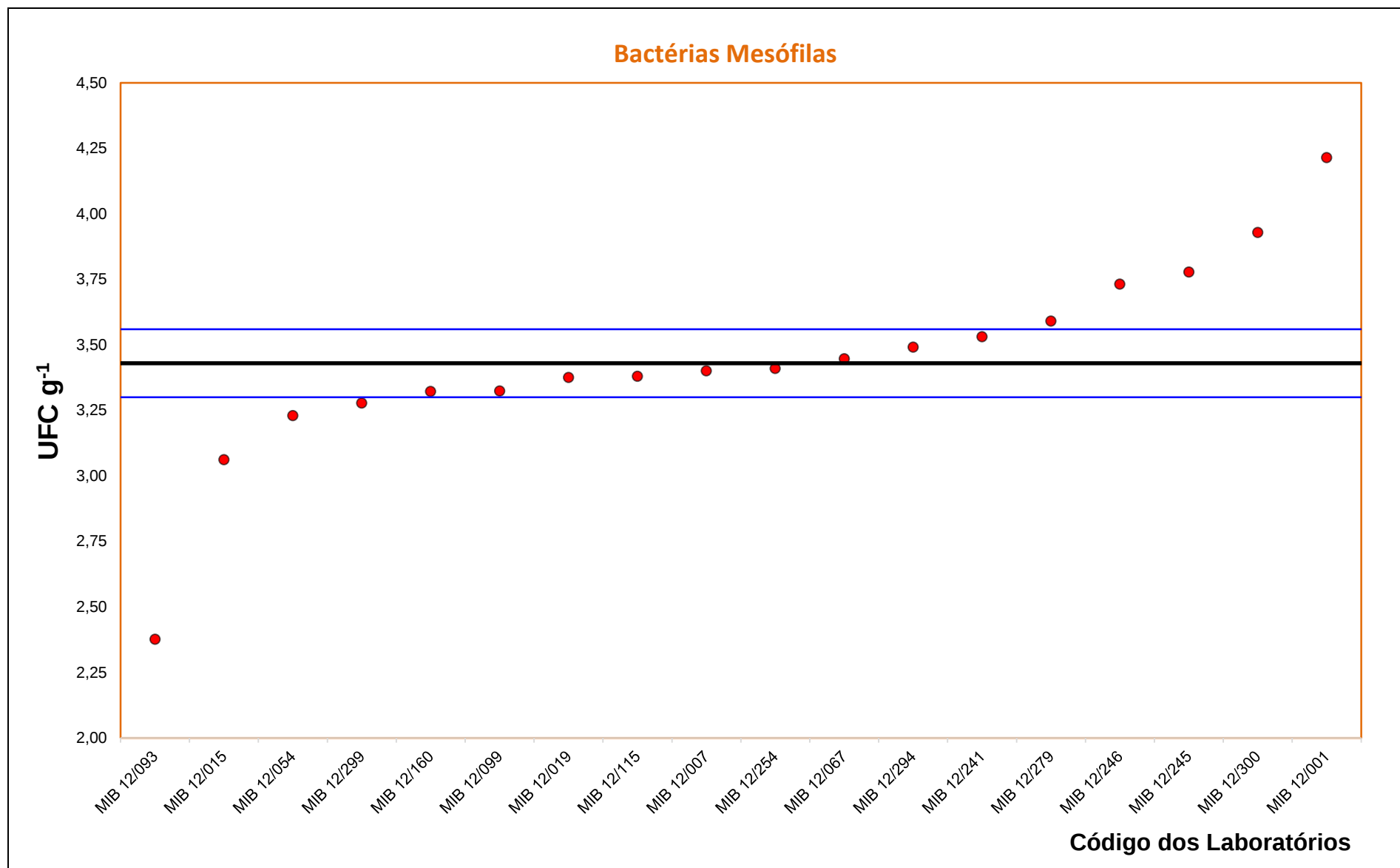
(1) APHA 4th Edition→ American Public Health Association - *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th, 2001.

(2) BRASIL. Farmacopeia Brasileira - 5ª Edição.

ISO 6222:1999→ Water quality -- Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.

MMAMAA→ da Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F.A.; *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água* – 3^{ed}, 2007 e 4^{ed}, 2010.

Figura 1: Dispersão dos resultados dos laboratórios participantes.



7.3. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 1), está apresentada na [Tabela 8](#).

Tabela 8: Valores do índice z obtido pelos laboratórios participantes.

Laboratórios	Item número	Resultado UFC g ⁻¹	z-score
MIB 12/001	06	16400	3,7
MIB 12/007	17	2520	-0,1
MIB 12/015	11	1155	-1,7
MIB 12/019	13	2375	-0,3
MIB 12/054	04	1700	-1,0
MIB 12/067	30	2800	0,1
MIB 12/093	20	238	-5,0
MIB 12/099	03	2112	-0,5
MIB 12/115	08	2400	-0,2
MIB 12/160	29	2100	-0,5
MIB 12/241	21	3400	0,5
MIB 12/245	01	6000	1,7
MIB 12/246	05	5400	1,4
MIB 12/254	33	2570	-0,1
MIB 12/279	12	3900	0,8
MIB 12/294	28	3100	0,3
MIB 12/299	19	1900	-0,7
MIB 12/300	18	8500	2,4

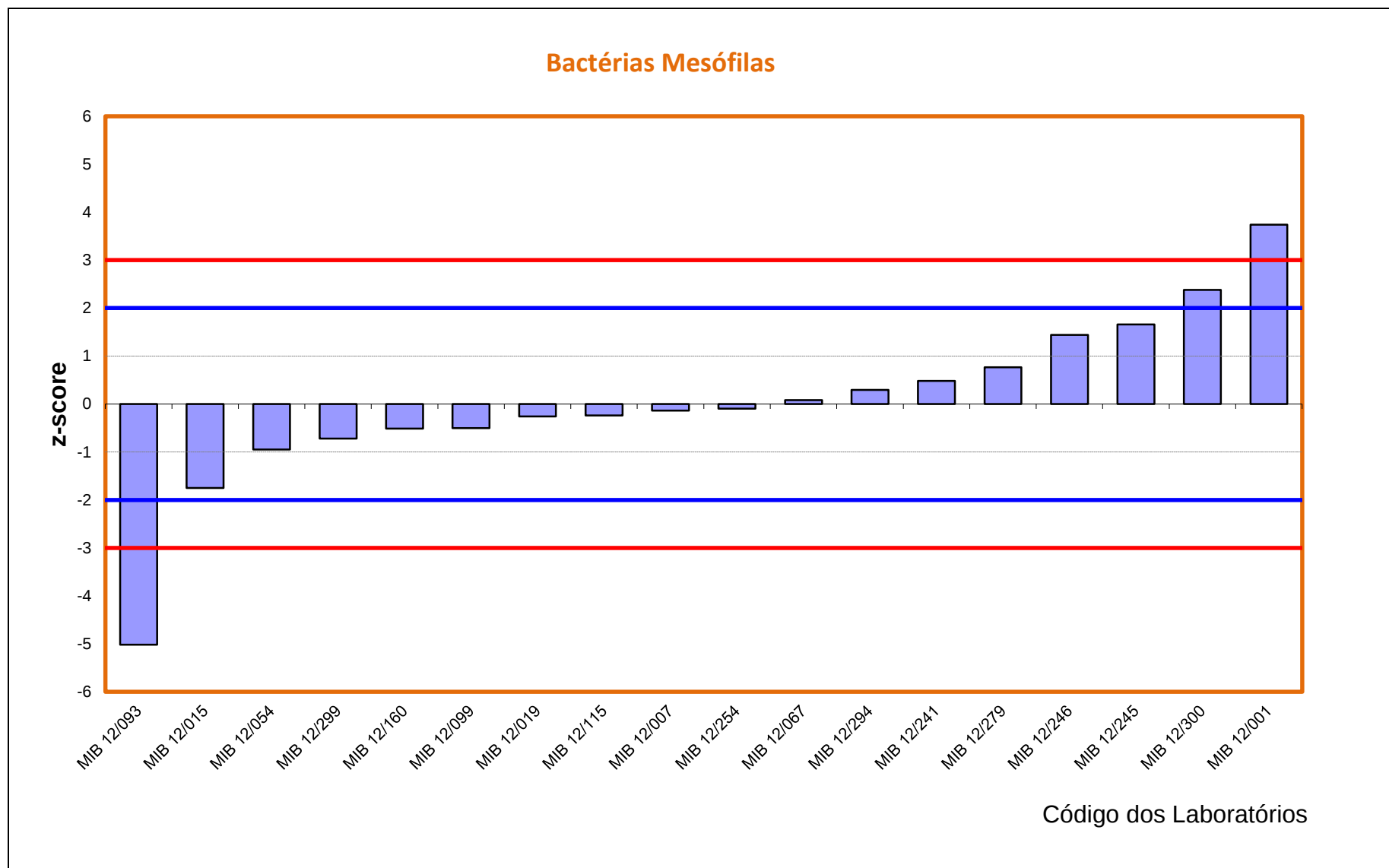
Azul = Resultado questionável

Vermelho = Resultado insatisfatório

A Figura 2 apresenta o resultado de índice z obtidos pelos laboratórios participantes para os itens de ensaio.

Lembramos que o [índice z](#) é apenas um indicativo do desempenho do laboratório, cabendo a cada participante fazer a sua interpretação e implementar, caso necessário, as ações corretivas.

Figura 2: Gráfico de z-score.



8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O número de laboratórios inscritos neste ensaio de proficiência totalizou vinte e quatro. Entre eles, 18 participantes (75%) encaminharam os resultados até a data prevista no protocolo;
- A maioria dos resultados reportados pelos laboratórios participantes (83,3%) atingiu o valor de índice $|z| \leq 2$, apenas um laboratório (5,6%) reportou resultado considerado questionável $2 < |z| < 3$ e dois laboratórios (11,1%) tiveram seus resultados considerados insatisfatórios $|z| \geq 3$;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- 15 (83,3%) dos laboratórios participantes utilizaram APHA, 2001 como metodologia de escolha, enquanto os outros 3 laboratórios utilizaram outras metodologias para análise;
- Para os laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios ou questionáveis, ações corretivas podem ser adotadas para o aprimoramento das suas medições. Uma avaliação detalhada, desde o recebimento do material e seu armazenamento, até o preenchimento do Formulário para Registro dos Resultados, e a avaliação de todos os passos da metodologia de análise, será importante para a identificação dos pontos críticos.

O estabelecimento de ações corretivas e a contínua participação em ensaios de proficiência são ferramentas de grande contribuição para o aprimoramento das medições realizadas pelos laboratórios.

9. Confidencialidade

Os resultados deste Ensaio de Proficiência são confidenciais, isto é, cada laboratório é identificado por código individual conhecido apenas pelos participantes da rodada e pela Coordenação deste Ensaio de Proficiência. Os resultados obtidos neste EP poderão ser utilizados em trabalhos e publicações do provedor mantendo evidentemente a confidencialidade dos laboratórios participante.

10. Referências Bibliográficas

ABNT ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2005**.

ABNT ISO/IEC 17043. Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais Para Ensaio de Proficiência, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2011**.

ABNT ISO GUIA 35. Materiais de Referência — Princípios Gerais e Estatísticos para Certificação, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2012**.

BRASIL. Portaria MS nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância e da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, n. 3, p.43, 04 jan. **2012**. Seção 1.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados ([VIM 2012](#)). Edição Luso-Brasileira. Rio de Janeiro, **2012**.

International Organization for Standardization – ISO 13528 - Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, **2005**.

A. Lamberty, H. Schimmel e J. Pauwels, “The Study of the Stability of Reference Materials by Isochronous Measurements” Fresenius J. Anal. Chemistry, pp. 359-361, **1997**.

The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, Nº 1, pp. 145–196, **2006**.

World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*. 3ª edição. v. 1, **2010**.

11. Relação de Laboratórios Participantes

A [Tabela 9](#) apresenta a relação dos Laboratórios Participantes que encaminharam os resultados à Comissão do Programa de Ensaio de Proficiência.

Tabela 9: Laboratórios participantes do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 12ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Matriz Água.

Laboratórios Participantes
BCQ Consultoria e Qualidade S/S LTDA
Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Centro de Laboratório Regional XII – Taubaté Laboratório de Microbiologia Alimentar
Fundação Ezequiel Dias - Funed - LACEN – MG Laboratório de Águas
Fundo Estadual de Saúde de Mato Grosso - LACEN – MT MT Laboratório – LACEN MT
Instituto Adolfo Lutz – Bauru Centro de Laboratório Regional de Bauru – CLR – IAL – Bauru II
Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional Campinas III
Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de Marília Laboratório de Microbiologia Alimentar do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas
Instituto Adolfo Lutz - Centro de Laboratório Regional de Presidente Prudente V Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – Microbiologia Alimentar
Instituto Adolfo Lutz - CLR - São José do Rio Preto Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto
Instituto Adolfo Lutz - IAL Núcleo de Microbiologia
Instituto Adolfo Lutz - IAL Núcleo de Ensaios Microbiológicos e de Segurança
Instituto Adolfo Lutz de Santo André VIII Microbiologia Alimentar - NCQB
Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros - LACEN – GO
Laboratório Nacional Agropecuário em Goiás Laboratório de Microbiologia em Alimentos e Água
LACEN – AC Divisão de Produtos – Laboratório de Microbiologia
Prefeitura do Município de São Paulo - Secretaria de Saúde - Coordenação de Vigilância em Saúde (COVISA) Laboratório de Controle de Qualidade em Saúde
Prefeitura Municipal de Guarulhos Laboratório Municipal de Saúde Pública Dr. Jefferson de Araújo

- Total de participantes: 18 laboratórios
- O código de cada participante **não** está associado à ordem da lista de participantes.

Anexo A – Homogeneidade Segundo o Protocolo Harmonizado

Da temperatura de referência, foram retirados aleatoriamente vinte e quatro itens de ensaio. Após a reconstituição dos líofilos. Para cada um dos lotes foram preparadas diluições decimais sucessivas, de acordo com as concentrações conhecidas. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em superfície de ágar Baird Parker. Os frascos foram analisados em ordem aleatória e sob condições de repetitividade, segundo a metodologia descrita por Bennett e Lancette (2001). Para verificar a ocorrência de problemas estatísticos, os dados foram dispostos num gráfico simples de resultados x número de amostra e analisados visualmente em busca de características usuais em diagnóstico, tais como:

- (a) tendências ou descontinuidades;
- (b) distribuição não-aleatória de diferenças entre o primeiro e segundo resultado de ensaio;
- (c) arredondamento excessivo; e
- (d) resultados dispersos intra-amostras.

Como não foi verificado nenhum problema estatístico, os dados foram usados para estimar as variâncias analíticas e amostral conforme descrito abaixo:

Valores Dispersos

Primeiramente foi aplicado o teste de *Cochran* aos resultados, com o propósito de eliminar possíveis valores dispersos. Assim, calculou-se a soma, S_i , e a diferença, D_i , de cada par de resultados, para $i = 1$ até 10.

Calculou-se a soma dos quadrados S_{DD} das m diferenças a partir da Equação 1:

$$S_{DD} = \sum D_i^2 \quad (1)$$

A estatística do teste de *Cochran* (Equação 2) é a razão entre $D_{\max}^2$, a maior diferença ao quadrado, e a soma dos quadrados das diferenças:

$$C = \frac{D_{\max}^2}{S_{DD}} \quad (2)$$

Foi calculada a razão acima e comparada com o valor crítico apropriados da tabela de teste de *Cochran* para um nível de confiança de 95 %.

Não-homogeneidade significativa

A mesma soma dos quadrados das diferenças (Equação 4) foi utilizada para calcular a variância analítica, s_{an}^2 , Equação 3.

$$s_{an}^2 = MS_w = (\sum D_i^2) / 2m \quad (3)$$

Onde D_i é a diferença de cada par de resultados do teste de homogeneidade e m é o número de recipientes selecionados para o teste de homogeneidade.

A seguir, calculou-se a variância V_S das somas S_i de acordo com a Equação 4:

$$v_s = 2 \times MS_B = \sum (s_i - \bar{s})^2 / (m-1) \quad (4)$$

Onde $\bar{s}$ é a média de S_i .

Calculou-se a variância amostral, s_{sam}^2 , de acordo com a Equação 5

$$s_{sam}^2 = (MS_B - MS_w) / 2 \quad (5)$$

Calculou-se a variância amostral aceitável, σ_{all}^2 , como $\sigma_{all}^2 = (0,3 \times \sigma_p)^2$ onde σ_p é o desvio padrão para avaliação da homogeneidade.

Tomando-se os valores de F_1 e F_2 , onde $F_1 = \frac{\chi_{m-1; 0,95}^2}{(m-1)}$ e $F_2 = \frac{(F_{m-1; m; 0,95} - 1)}{2}$, calculou-se o valor crítico de homogeneidade para o ensaio como (Equação 6):

$$c = F_1 \times \sigma_{all}^2 + F_2 \times s_{an}^2 \quad (6)$$

Como $s_{sam}^2 < c$, não há evidência de que o desvio-padrão amostral na população de amostras ultrapassa a fração aceitável do desvio-padrão alvo.

Anexo B – Valor Designado Segundo a Norma ISO 13528

A Norma ISO 13528 é um documento complementar à ISO GUIA 43 e fornece os métodos estatísticos a serem empregados nos ensaios de proficiência. Este documento descreve a análise robusta envolvendo o emprego da estimativa do algoritmo A para o cálculo do valor designado e do desvio padrão. Neste EP, somente o valor designado foi calculado através da análise robusta, sendo o desvio padrão estimado através das equações derivadas do modelo geral de Horwitz (4.3.3).

Inicialmente, todos os valores objetos da análise (valores enviados pelos laboratórios participantes) foram colocados em ordem crescente. A seguir, foram calculados os valores da mediana de x_i (x^*) e do desvio padrão (s^*), conforme as Equações 1 e 2.

$$x^* = \text{medianade } x_i \quad (1)$$

$$s^* = 1,483 \times \text{med} |x_i - x^*| \quad (2)$$

Onde: *med* é a mediana; x_i valor de concentração reportado pelo laboratório.

Em seguida, foi calculado o valor de F_i , segundo a Equação 3, e a partir da estimativa de F_i , calculou-se o novo valor inferior (concentração inferior), e o novo valor superior (concentração superior), através das Equações 4 e 5.

$$F_i = 1,5s^* \quad (3)$$

$$\text{Novo Valor Superior} = x^* + F_i \quad (4)$$

$$\text{Novo Valor Inferior} = x^* - F_i \quad (5)$$

Os novos valores, superior e inferior, foram comparados a cada um dos resultados individuais dos laboratórios participantes, e os que estavam acima do valor superior ou abaixo do valor inferior foram descartados, ou seja, foram considerados valores dispersos ou discrepantes e substituídos pelos novos valores superiores e inferiores. Este procedimento compreende a um ciclo ou **Ciclo 0**.

Iniciou-se um novo ciclo, a partir do cálculo da média robusta (x^*)¹ e do desvio padrão (s) dos novos valores encontrados, e a seguir calculou-se o novo desvio padrão robusto (s^*)². O novo valor de s^* foi calculado pela Equação 6:

$$S^* = 1,134s \quad (6)$$

¹ Na ISO 13528 quando se inicia o **Ciclo 1**, x^* passa a ser denominado como média robusta, uma vez que advém de um algoritmo robusto.

² Na ISO 13528 quando se inicia o **Ciclo 1**, s^* passa a ser denominado como desvio padrão robusto, uma vez que advém de um algoritmo robusto.

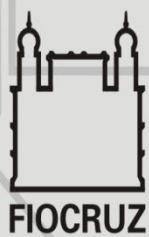
Em seguida, calculou-se novamente o valor de F_i , os novos valores superiores e inferiores, conforme descrito, respectivamente, nas Equações 3, 4 e 5, sendo os valores discrepantes substituídos pelos novos limites. Este procedimento corresponde a outro ciclo ou **Ciclo 1**.

O ciclo é reiniciado até o momento em que os valores da nova média robusta (x^*) e do novo desvio padrão robusto (s^*) convergirem, ou seja, até que não haja nos ciclos, diferença entre eles. Neste momento o ciclo é finalizado e os novos valores de x^* e s^* , que são os valores da média robusta (valor designado do EP) e do desvio padrão robusto.

Para a incerteza do valor designado descrito, será adotada a fórmula apresentada no item 5.6.2 da norma ISO 13528, específica para valores designados obtidos a partir do algoritmo A. A incerteza padrão será calculada pela Equação 7:

$$u_{x^*} = 1,25 \times s^* / \sqrt{p} \quad (7)$$

Onde, s^* é o desvio padrão robusto e p é o número de laboratórios



FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
INCQS - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Av. Brasil 4365 • Manguinhos • CEP 21040 900
Rio de Janeiro • RJ • Brasil
www.incqs.fiocruz.br