

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

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia  
de Alimentos 25ª Rodada –  
Contagem de Bactérias Mesófilas  
em Água**

**EP MIB 25/17**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz





**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada –  
Contagem de Bactérias Mesófilas em 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

**- COMITÊ TÉCNICO**

Carla de Oliveira Rosas  
Ingrid Camelo da Silva  
Luiza Vasconcellos  
Marcelo Luiz Lima Brandão  
Sílvia Maria dos Reis Lopes  
Valéria de Mello Medeiros

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

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	3
2. Objetivos .....	4
3. Produção 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 .....	5
3.5. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio.....	5
3.6. Recebimento do Item de Ensaio .....	6
3.7. Análise dos Itens de Ensaio.....	6
4. Tratamento 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 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 Valore 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.....	14
8. Conclusões e Comentários.....	17
9. Confidencialidade .....	17
10. Referências Bibliográficas.....	18
11. Laboratórios Participantes .....	19
Anexo A – Homogeneidade Segundo o Protocolo Harmonizado .....	20
Anexo B – Valor Designado Segundo a Norma ISO 13528 .....	22

## 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, no âmbito 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 à promoção da saúde e à competitividade da indústria nacional, o INCQS promoveu o Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Água - seguindo as diretrizes da [ABNT ISO/IEC 17043](#). Os resultados da avaliação de desempenho dos laboratórios participantes estão neste relatório.

## 2. Objetivos

O objetivo deste Ensaio de Proficiência é fornecer aos laboratórios participantes uma ferramenta efetiva para verificar sua competência no ensaio de contagem de Bactérias Mesófilas em Água, utilizando metodologia analítica empregada 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 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 (DM) 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](#) n° 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<sup>-1</sup>.

### 3.2. Preparo do Item de Ensaio

Para este EP foram utilizados dois lotes de itens de ensaio distintos. Um dos lotes foi preparado exclusivamente com uma cepa de *Escherichia coli* depositada na “Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P4328, e outro lote foi produzido com uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, da mesma coleção do INCQS/FIOCRUZ, identificada como P4399.

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

### 3.3. Faixa de Concentração Esperada

Os lotes de itens de ensaio, após a etapa de liofilização, apresentaram concentrações aproximadas de  $4,0 \times 10^2$  UFC. mL<sup>-1</sup> para *E. coli* e  $8,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para *K. pneumoniae*.

### 3.4. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

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

Foi realizado o estudo de estabilidade de longa duração (referência e armazenamento). A estabilidade de curta duração, que verifica a influência da temperatura nas condições de transporte, não foi realizada, pois estudos prévios<sup>1</sup> indicaram que os itens de ensaio devem ser transportados em gelo seco. Para os estudos de longa duração foi feito o controle de estoque a -70°C (temperatura de referência - *ultrafreezer*) e a  $\leq -10^\circ\text{C}$  (temperatura de armazenamento durante o EP - *freezer*). Os testes da estabilidade a -70 e -10°C foram iniciados após o preparo dos lotes e abrangeram o tempo disponibilizado aos laboratórios para a análise do item de ensaio.

Para os estudos da homogeneidade e da estabilidade foi empregada a metodologia de semeadura em profundidade em ágar padrão para contagem, segundo a metodologia descrita no [Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater \(APHA, 2012\)](#).

### 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 no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Água foram enviados 2 (dois) frascos contendo os micro-organismos liofilizados *E. coli* e *K. pneumoniae*, separadamente, em concentrações desconhecidas. Os itens foram lacrados e identificados com as seguintes informações: o número da rodada, o item a ser ensaiado e o código da amostra.

Os frascos foram enviados aos laboratórios por via aérea, acondicionados 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, por meio do formulário de “**Instruções para Armazenamento e Preparo dos Itens de Ensaio**”, disponibilizado no site do INCQS/EP.

---

<sup>1</sup> Relatório final do EP MIB 12/14

### 3.6. Recebimento do Item de Ensaio

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

### 3.7. Análise dos Itens de Ensaio

Os laboratórios participantes foram orientados a realizar as análises para contagem de Bactérias Mesófilas segundo a metodologia empregada no laboratório e expressar os resultados em **UFC.mL<sup>-1</sup>**. Os resultados analíticos, bem como as informações sobre a metodologia e os meios de cultura utilizados, foram encaminhados à Coordenação do Ensaio de Proficiência por meio do “**Formulário de Registro de Resultados**”.

## 4. Tratamento dos Resultados

Neste tópico estão descritas as análises estatísticas utilizadas para a avaliação da homogeneidade e da estabilidade das amostras, para a obtenção dos valores designados e suas incertezas, 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 está apresentado no [Anexo A](#). Os resultados encontram-se no item [5.1](#).

### 4.2 Avaliação da Estabilidade dos Itens de Ensaio

Esses testes foram empregados para se avaliar a estabilidade das concentrações de *E. coli* e *K. pneumoniae* em função do tempo (longa 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). As concentrações de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram consideradas estáveis quando a inclinação da reta (ou a não linearidade) não foi significativa e o gráfico da concentração em função do tempo não apresentou tendências. Os resultados encontram-se no item [5.2](#).

### 4.3 Valor Designado ( $\bar{x}$ ) e suas Incertezas ( $u_{\bar{x}}$ )

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 valores designados para a concentração do lote, aquele oriundo do cálculo da estatística robusta apresentado no Anexo C da norma [ISO 13528](#), norma específica de métodos estatísticos para uso em EP por comparações interlaboratoriais. Seguindo os critérios

desta norma, os valores designados foram obtidos pela média robusta dos resultados emitidos por todos os 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 7.6 da norma [ISO 13528](#), isto é, a partir do desvio padrão robusto calculado a partir dos resultados dos participantes, 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 liófilo, sendo os resultados expressos em UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 5.1. Avaliação da Homogeneidade

Os resultados do teste de homogeneidade realizado com os itens de ensaio dos lotes de *E. coli* e *K. pneumoniae*, estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2. Para cada item de ensaio foram realizadas duas análises produzindo dois resultados (A e B).



Tabela 1: Dados gerados nos testes de homogeneidade, em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Item de Ensaio	Lote de <i>Escherichia coli</i>				Lote de <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	Contagem		Log <sub>10</sub>		Contagem		Log <sub>10</sub>	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	490	552	2,69	2,74	730000	810000	5,86	5,91
2	300	430	2,48	2,63	770000	620000	5,89	5,79
3	544	426	2,74	2,63	660000	510000	5,82	5,71
4	350	508	2,54	2,71	670000	670000	5,83	5,83
5	306	794	2,49	2,90	860000	660000	5,93	5,82
6	182	690	2,26	2,84	600000	910000	5,78	5,96
7	256	630	2,41	2,80	590000	690000	5,77	5,84
8	<b>528</b>	<b>34</b>	<b>2,72</b>	<b>1,53</b>	820000	690000	5,91	5,84
9	534	522	2,73	2,72	770000	880000	5,89	5,94
10	304	640	2,48	2,81	650000	540000	5,81	5,73
11	494	612	2,69	2,79	340000	550000	5,53	5,74
12	488	534	2,69	2,73	690000	750000	5,84	5,88
13	536	594	2,73	2,77	660000	620000	5,82	5,79
14	466	542	2,67	2,73	570000	460000	5,76	5,66
15	556	586	2,75	2,77	520000	490000	5,72	5,69
16	336	686	2,53	2,84	500000	570000	5,70	5,76
17	386	734	2,59	2,87	590000	620000	5,77	5,79
18	662	590	2,82	2,77	500000	610000	5,70	5,79
19	672	690	2,83	2,84	590000	690000	5,77	5,84
20	662	406	2,82	2,61	540000	740000	5,73	5,87

Em **vermelho** resultados *outlier*, retirados da análise.

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

Tabela 2: Sumário da análise estatística, em log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Lote	Média	$\sigma_p$	$\sigma_{all}^2$	$s_{an}^2$	$s_{sam}^2$	c	Resultado
<i>E. coli</i>	<b>2,69</b>	0,25	0,00562	0,02808	0,00000	0,02562	Homogeneidade Suficiente
<i>K. pneumoniae</i>	<b>5,80</b>	0,25	0,0562	0,00447	0,00294	0,01147	Homogeneidade Suficiente

De acordo com os resultados apresentados, os lotes foram considerados suficientemente homogêneos.

## 5.2. Avaliação da Estabilidade

No decorrer do EP, foram avaliadas as flutuações temporais nas concentrações de *E. coli* e *K. pneumoniae* nas temperaturas de referência (-70°C) e de armazenamento ( $\leq$  -10°C). Os resultados da estabilidade de longa duração estão apresentados nas Tabelas [3](#), [4](#) e [5](#).

Tabela 3: Estudo de estabilidade dos lotes de *E. coli* e *K. pneumoniae* - temperatura de referência (-70 °C) em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Dias	<i>Escherichia coli</i>			Dias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias		Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias
0	530	500	2,71	0	560000	750000	5,81
21	580	630	2,78	29	520000	640000	5,76
41	370	410	2,59	49	560000	570000	5,75
63	450	530	2,69	70	460000	490000	5,68
86	520	490	2,70	91	480000	330000	5,60
107	510	500	2,70	113	480000	470000	5,68
126	540	490	2,71	133	590000	600000	5,77
145	430	190	2,46				

Tabela 4: Estudo de estabilidade dos lotes de *E. coli* e *K. pneumoniae* - temperatura de armazenamento ( $\leq -10$  °C) em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Dias	<i>Escherichia coli</i>			Dias	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias		Média Item 1	Média Item 2	Log das Médias
0	424	578	2,69	0	618016	644169	5,80
7	500	400	2,65	7	420000	790000	5,76
30	450	190	2,47	27	520000	510000	5,71
33	510	490	2,70	42	550000	470000	5,71
48	440	470	2,66	56	570000	740000	5,81
65	360	400	2,58	70	510000	590000	5,74
84	440	510	2,68	94	530000	520000	5,72

Tabela 5: Análise de Regressão - Diferentes estudos de estabilidade, em Log<sub>10</sub> UFC.mL<sup>-1</sup>.dias<sup>-1</sup>.

	Coeficiente Angular	Erro Padrão	Intervalo de Confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Referência ( <i>E. coli</i> )	-0,00098	0,00069	-0,00267	0,00071	Estável
Referência ( <i>K. pneumoniae</i> )	-0,00073	0,00062	-0,00231	0,00085	Estável
Armazenamento ( <i>E. coli</i> )	-0,00021	0,00123	-0,00338	0,00296	Estável
Armazenamento ( <i>K. pneumoniae</i> )	-0,00042	0,00053	-0,00178	0,00095	Estável

Considerando os resultados obtidos nos estudos de estabilidade podemos concluir que os itens de ensaio mostraram-se suficientemente estáveis nas condições dos estudos, uma vez que o intervalo de confiança para o coeficiente angular abrangeu o valor zero (0).

## 6. Atribuição do Valor Designado

O valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, estão apresentados na [Tabela 6](#).

Tabela 6: Valor designado ( $x^*$ ), desvio padrão ( $s^*$ ), incertezas do valor designado ( $\text{Log}_{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

	$x^*$	$s^*$	$s^*(\%)$	$u_c$	$k$	$U$
<i>Escherichia coli</i>	1,751	0,339	19,4	0,095	2,14	0,203
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,39	0,66	15,0	0,18	2,13	0,38

As incertezas combinadas de  $X^*$  foram menores que  $0,3s^*$ , podendo ser negligenciadas nas avaliações.

## 7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

### 7.1. Laboratórios Participantes

Vinte e dois laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Água - e vinte e um (95,5%) enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, três (14,3%) são acreditados na norma [ISO/IEC 17025](#) e cinco laboratórios (23,8 %) encontram-se em processo de acreditação na norma citada.

Quanto à natureza do laboratório, dezoito (85,7%) são governamentais (Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacens) ou laboratórios vinculados à Vigilância Sanitária municipais. Três laboratórios privados completam a lista de participantes. A [Tabela 9](#) apresenta a listagem dos laboratórios participantes.

### 7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Os dados reportados pelos laboratórios 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.

Os gráficos das dispersões dos resultados dos laboratórios participantes encontram-se nas Figuras [1](#) e [2](#). Neste gráfico a linha central representa o valor designado e as linhas pontilhadas o intervalo da incerteza expandida ( $U$ ) do valor designado.

Tabela 7: Resultados por análise e metodologia empregada.

Código dos Laboratórios	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Metodologias <sup>(1)</sup>
	Número do Item	Resultados (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Número do Item	Resultados (UFC.mL <sup>-1</sup> )	
MIB 25/001	050	52	017	7.700	APHA
MIB 25/006	012	22	056	22.000	APHA
MIB 25/009	052	65	035	51.500	APHA
MIB 25/012	053	60	006	15.000	APHA
MIB 25/013	023	30	042	5,7 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/016	011	6,4 x 10 <sup>1</sup>	029	4,7 x 10 <sup>4</sup>	APHA e CETESB
MIB 25/020	024	45	055	54.500	Outros
MIB 25/032	021	2,8 x 10 <sup>2</sup>	007	6,5 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/033	NÃO ENVIOU RESULTADO				
MIB 25/035	004	8	033	4,0 x 10 <sup>3</sup>	APHA e CETESB
MIB 25/038	037	1,2 x 10 <sup>2</sup>	005	6,0 x 10 <sup>5</sup>	Outros
MIB 25/041	038	7,4 x 10	016	5,5 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/047	045	6 x 10	040	3,9 x 10 <sup>3</sup>	Outros
MIB 25/048	039	5,0 x 10	009	2,6 x 10 <sup>3</sup>	APHA
MIB 25/051	044	8	048	7,7 x 10 <sup>3</sup>	Outros
MIB 25/057	014	4,5 x 10	041	2,1 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/061	051	< 10	027	5,0 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/073	036	5,3 x 10 <sup>2</sup>	028	3,7 x 10 <sup>2</sup>	APHA
MIB 25/075	034	7,1 x 10	020	1,92 x 10 <sup>4</sup>	APHA
MIB 25/076	010	3,9 x 10 <sup>2</sup>	025	2,9 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 25/095	019	45	008	58000	APHA
MIB 25/099	001	40	030	42600	Outros

(1) APHA<sup>®</sup> → Microbiological examination of water. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>ed.</sup>, 2012;

CETESB → L5.201: Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. Norma técnica. São Paulo, 2006.

Outros:

APHA<sup>®</sup> → Culture Methods for Enumeration of Micro-organisms. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4<sup>ed.</sup>, 2001;

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

MMAMAA → da Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F.A.; *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água* – 4<sup>th</sup>, 2010;

USP40

Figura 1: Dispersão dos resultados: Escherichia coli

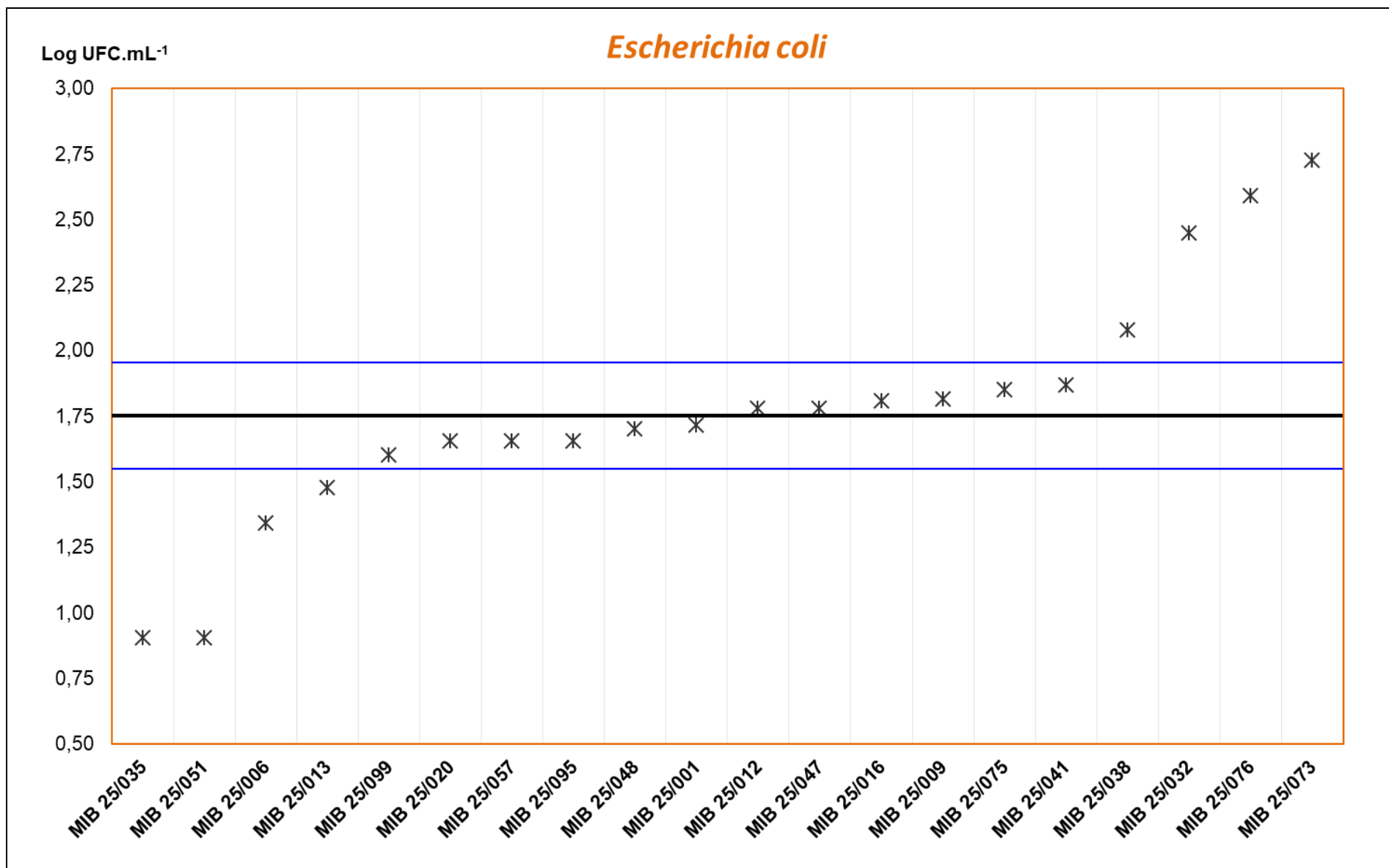
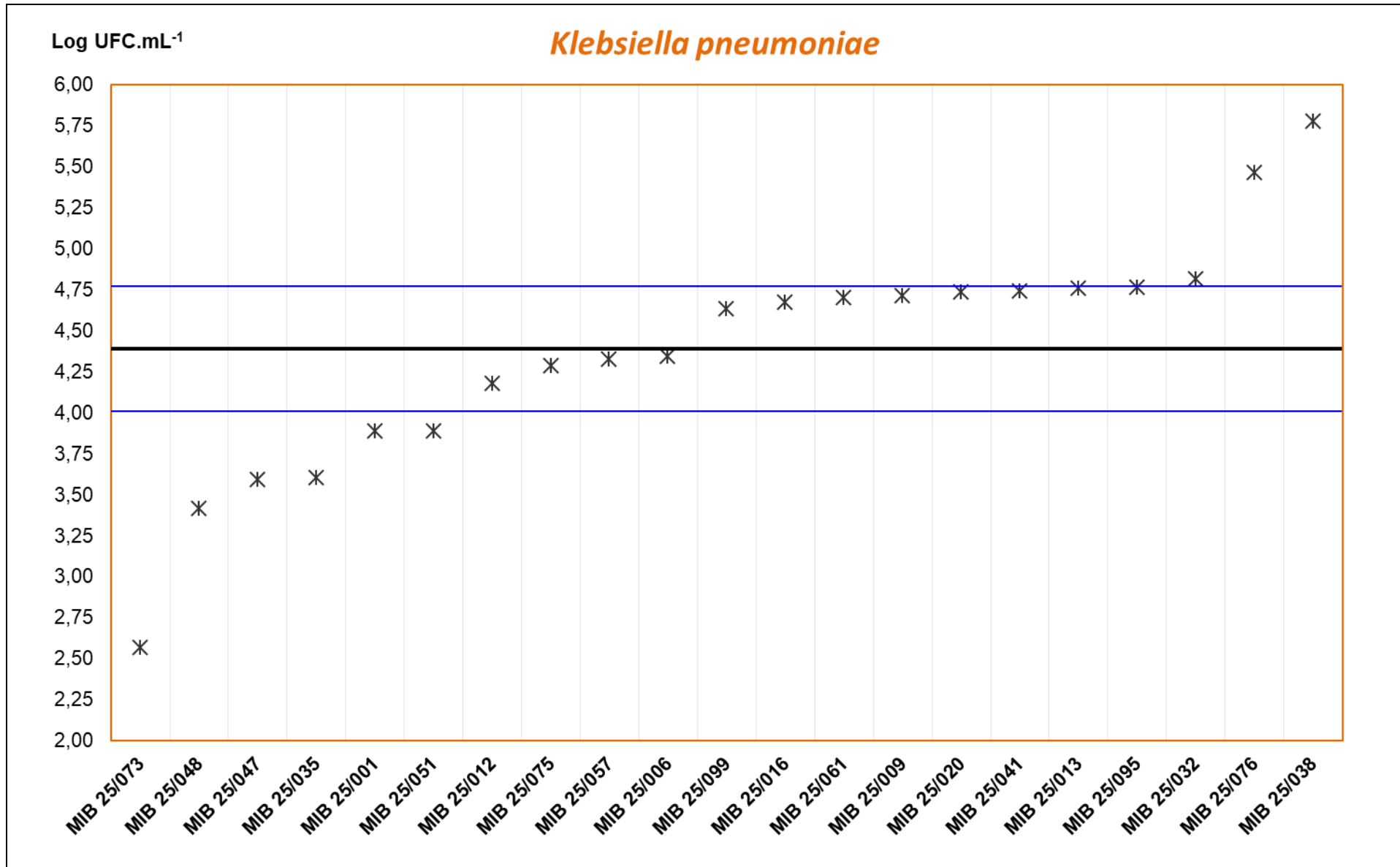


Figura 2: Dispersão dos resultados: *Klebsiella pneumoniae*



### 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 obtidos pelos laboratórios participantes.

Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Índice z	Número do Item	Resultados (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Índice z
MIB 25/001	050	52	-0,1	017	7.700	-0,7
MIB 25/006	012	22	-1,2	056	22.000	0,0
MIB 25/009	052	65	0,1	035	51.500	0,4
MIB 25/012	053	60	0,0	006	15.000	-0,3
MIB 25/013	023	30	-0,8	042	5,7 x 10 <sup>4</sup>	0,5
MIB 25/016	011	6,4 x 10 <sup>1</sup>	0,1	029	4,7 x 10 <sup>4</sup>	0,4
MIB 25/020	024	45	-0,2	055	54.500	0,5
MIB 25/032	021	2,8 x 10 <sup>2</sup>	2,0	007	6,5 x 10 <sup>4</sup>	0,6
MIB 25/035	004	8	-2,5	033	4,0 x 10 <sup>3</sup>	-1,1
MIB 25/038	037	1,2 x 10 <sup>2</sup>	0,9	005	6,0 x 10 <sup>5</sup>	2,1
MIB 25/041	038	7,4 x 10	0,3	016	5,5 x 10 <sup>4</sup>	0,5
MIB 25/047	045	6 x 10	0,0	040	3,9 x 10 <sup>3</sup>	-1,2
MIB 25/048	039	5,0 x 10	-0,1	009	2,6 x 10 <sup>3</sup>	-1,4
MIB 25/051	044	8	-2,5	048	7,7 x 10 <sup>3</sup>	-0,7
MIB 25/057	014	4,5 x 10	-0,2	041	2,1 x 10 <sup>4</sup>	-0,1
MIB 25/061	051	< 10	Não avaliado	027	5,0 x 10 <sup>4</sup>	0,4
MIB 25/073	036	5,3 x 10 <sup>2</sup>	2,8	028	3,7 x 10 <sup>2</sup>	-2,7
MIB 25/075	034	7,1 x 10	0,2	020	1,92 x 10 <sup>4</sup>	-0,1
MIB 25/076	010	3,9 x 10 <sup>2</sup>	2,4	025	2,9 x 10 <sup>5</sup>	1,6
MIB 25/095	019	45	-0,2	008	58000	0,5
MIB 25/099	001	40	-0,4	030	42600	0,3

Em azul, resultados questionáveis.

As Figuras 3 e 4 apresentam os resultados de índice z obtidos pelos laboratórios participantes para os itens de ensaio. O índice z foi calculado apenas para os laboratórios que enviaram resultados numéricos.

Resultado “menor que”, bem como os laboratórios que não observaram crescimento, não foram considerados para o cálculo de z-score e tiveram os resultados considerados **insatisfatórios**.

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 3: Gráfico de z-score: *Escherichia coli*

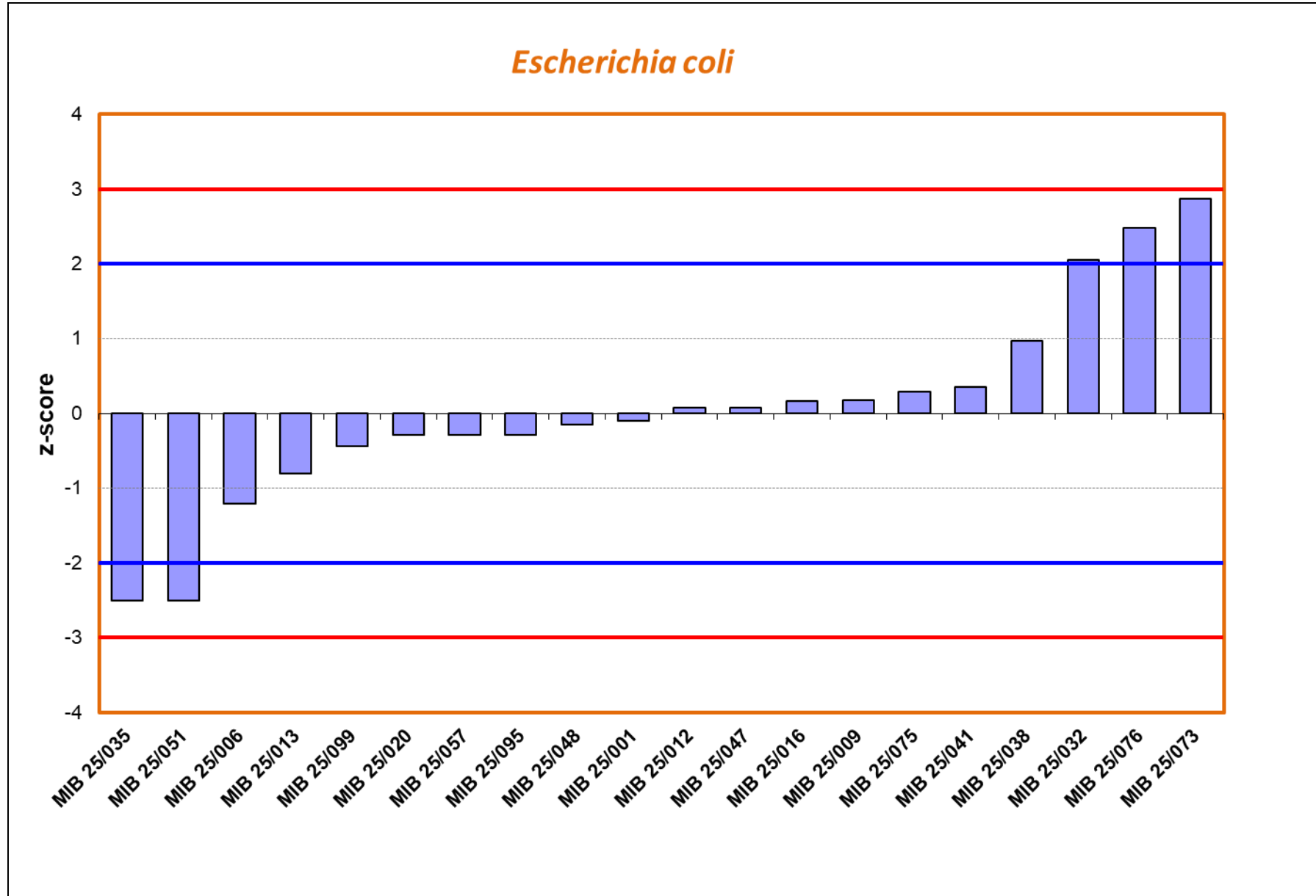
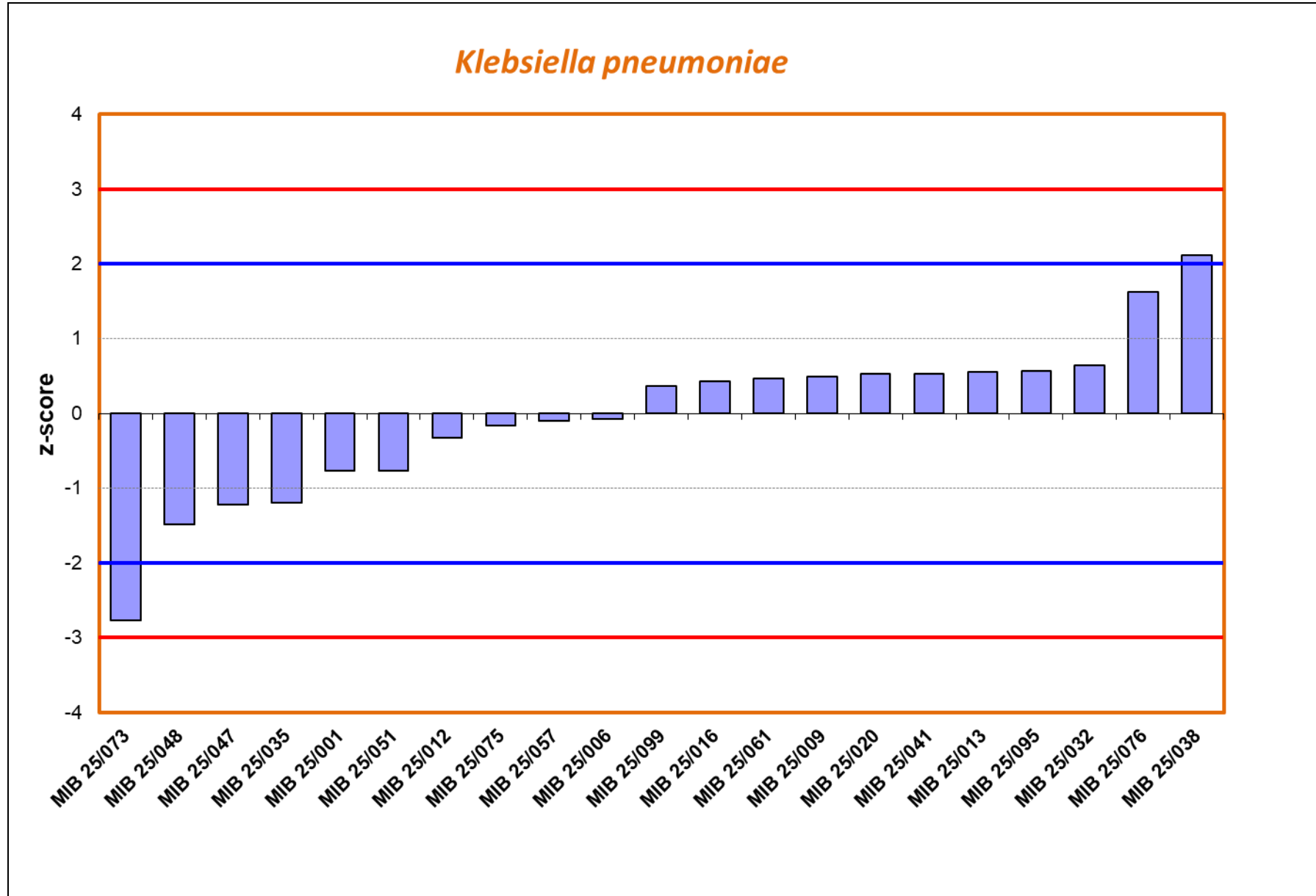




Figura 4: Gráfico de z-score: *Klebsiella pneumoniae*



## 8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- Num total de vinte e dois laboratórios inscritos, vinte e um (95,5%) encaminharam os resultados até a data prevista no protocolo;
- Vinte laboratórios enviaram os dois resultados expressos numericamente e entre eles quinze atingiram o valor de índice  $z \leq |2|$ , considerado **satisfatórios**, e quatro laboratórios foram considerados **questionáveis**. O laboratório que enviou o resultado como “menor que” não foi avaliado para este item de ensaio;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Dezesseis (76,2%) dos laboratórios participantes utilizaram **como metodologia** o *Microbiological Examination of Water and Wastewater*, APHA, enquanto os outros laboratórios utilizaram metodologias diferentes para a análise;
- Para os laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios, ações corretivas podem ser adotadas para o aprimoramento das suas medições. Fatores importantes para a identificação dos pontos críticos vão desde uma avaliação detalhada do recebimento do material, de seu armazenamento, do preenchimento do *Formulário para Registro dos Resultados* e da avaliação da metodologia de análise.

Finalmente, é importante ressaltar que o estabelecimento de ações corretivas e a contínua participação em ensaios de proficiência desta natureza 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 pelo participante da rodada e pela Coordenação deste Ensaio de Proficiência. Os resultados obtidos neste EP poderão ser utilizados em trabalhos e publicações do provedor mantendo a confidencialidade dos laboratórios participantes.

## 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**.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22. ed. Washington, D.C., 2012.

BRASIL. Portaria Nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõem sobre os Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade. Diário Oficial [da] União, Brasília, Brasília, n.239, p.39, 14 dez. 2011. Seção 1.

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.

Lambert, A., Schimmel, H., Pauwels, J., “The study of the stability of reference materials by isochronous measurements”, Fresenius J. Anal. Chemistry, 360 (1997), pp 359-361.

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. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 9](#).

Tabela 9: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 25ª Rodada – Contagem de Bactérias Mesófilas em Água.

<b>Laboratórios Participantes</b>
Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo de Ribeirão Preto
COCAM Cia de Café Solúvel e Derivados
IBERPHARM Laboratórios do Brasil LTDA
Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Bauru Laboratório de Microbiologia Alimentar
Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas - Lacen/AL
Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amazonas - Lacen/AM
Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga - Lacen/PI
Laboratório Central Dr. Almino Fernandes - Lacen/RN
Laboratório de Águas do Lacen/MG
Laboratório de Microbiologia Alimentar
Laboratório de Microbiologia Alimentar Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos
Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas CLR – Campinas
Laboratório Municipal de Saúde Pública – LASP
Laboratório Municipal de Saúde Pública Dr. Jefferson Ignácio de Araújo
Lacen SC
Lacen CE
Núcleo de Microbiologia - Instituto Adolfo Lutz
Seção de Medicamentos, Cosméticos, Saneantes e Produtos para Saúde - Lacen GO
Seção de Microbiologia de Águas - Lacen/PR
Seção de Microbiologia de Alimentos e Água - Lacen GO
VMC Comércio Varejista, Análises, Consultoria e Treinamento LTDA

- Total de participantes: 21 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 itens de ensaio. Os frascos foram analisados sob condições de repetitividade. Dos frascos representantes do lote, após a reconstituição dos líofilos, foram preparadas diluições sucessivas, de acordo com a concentração conhecida. 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,  $\sigma_{all}^2$ , como  $\sigma_{all}^2 = (0,3 \times \sigma_p)^2$  onde  $\sigma_p$  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 ABNT ISO/IEC 17043 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, estes valores foram calculados através da análise robusta.

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  $(x^*)^2$  e do desvio padrão ( $s$ ) dos novos valores encontrados, e a seguir calculou-se o novo desvio padrão robusto  $(s^*)^3$ . O novo valor de  $s^*$  foi calculado pela Equação 6:

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

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**.

<sup>2</sup> 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.

<sup>3</sup> 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.

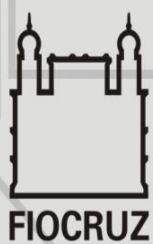
O ciclo é reiniciado até o momento em que os valores da nova média robusta ( $x^*$ ) e do novo desvio padrão robusto ( $s^*$ ) variem após a 3 casa decimal ou após 10 ciclos, o que ocorrer primeiro.

Para a incerteza do valor designado descrito, será adotada a fórmula apresentada no item 7.7.3 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](http://www.incqs.fiocruz.br)