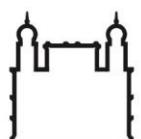


Ensaio de Proficiência em Produtos Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária (EP/INCQS)

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia
de Alimentos 28^a Rodada –
Contagem de Estafilococos Coagulase
Positiva em Frango**

EP MIB 28/17



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



***Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 28ª Rodada –
Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango***

RELATÓRIO FINAL – REVISÃO 01

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

Arni 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
Pablo Tavares Coimbra
Silvia Maria dos Reis Lopes
Valéria de Mello Medeiros

Autorizada a emissão – Arni 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	5
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	5
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 (x^*) e suas Incertezas (u_{x^*})	6
4.4 Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência	6
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	9
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes	9
7.1. Laboratórios Participantes	9
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes	9
7.3. Cálculo do Índice z	12
8. Conclusões e Comentários	14
9. Confidencialidade	14
10. Modificações em Relação a Versão Anterior	14
11. Referências Bibliográficas	15
12. Laboratórios Participantes	16
Anexo A – Homogeneidade Segundo o Protocolo Harmonizado	17
Anexo B – Estabilidade Segundo a Norma ISO 13528	19
Anexo C – 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, 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 dos alimentos é uma das grandes preocupações da saúde pública em todo o mundo. O controle da qualidade dos alimentos e as análises laboratoriais em casos de surtos de toxinfecções alimentares 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 dos alimentos 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 28ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango - 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 Estafilococos Coagulase Positiva em Frango, 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

Segundo o relatório de 2016 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a produção de frango em 2015 superou 13,1 milhões de toneladas, tendo o Brasil assumido o segundo lugar mundial e o principal exportador desse produto. O consumo per capita ficou em torno de 43 kg.habitante⁻¹.ano⁻¹.

Alimentos prontos para o consumo podem ser veículos de toxinfecção alimentar, quando preparados e estocados fora das condições higiênico-sanitárias adequadas. A [RDC nº12/2001](#), indica como um dos critérios microbiológicos para “pratos prontos para o consumo a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos”: o limite de 10^3 para estafilococos coagulase positiva.

Logo, a qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados para o controle microbiológico da carne de frango nestes laboratórios são de suma importância para que não venham a causar danos à saúde do consumidor.

3.2. Preparo do Item de Ensaio

Para este EP foi preparado um lote de item de ensaio **DUAS SEMANAS ANTES DO ENVIO AOS LABORATÓRIOS PARTICIPANTES** e foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* identificada como P4283 depositada na “Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”.

O lote foi preparado a partir da homogeneização da suspensão de células em solução crioprotetora, a uma concentração conhecida e controlada. Após a homogeneização, volumes de 0,5 mL foram distribuídos em frascos de vidro contendo a matriz previamente liofilizada. 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

O lote de *Staphylococcus aureus*, após a etapa de liofilização, apresentou concentração aproximadas de $5,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹.

3.4. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

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

Foram realizados os estudos de estabilidade de longa e de curta duração.

Para o estudo de longa duração, foi feito o controle de estoque a -70°C (temperatura de referência - *ultrafreezer*), e o estudo de curta (transporte) foi realizado nas temperaturas de 4 e 35°C.

Os testes da estabilidade foram iniciados após o prefeito dos lotes e abrangearam 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 contagem de ECP por plaqueamento direto, em ágar Baird Parker, descrita por [Bennett e Lancette \(2001\)](#).

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 28ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango - foi enviado 1 (um) frasco contendo o micro-organismo liofilizados. Os itens foram lacrados e identificados com as seguintes informações: o número da rodada, o item a ser ensaiado e o código da amostra.

O frasco foi enviado 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.

3.6. Recebimento do Item de Ensaio

Ao receber a amostra, 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 Estafilococos Coagulase Positiva segundo a metodologia empregada no laboratório e expressar os resultados em **UFC.g⁻¹**. 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

A norma [ISO 13528](#) foi seguida na avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio. Um resumo do procedimento estabelecido neste documento está apresentado no [Anexo B](#). Os resultados encontram-se no item [5.2](#).

4.3 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 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 C.

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.g⁻¹.

5.1. Avaliação da Homogeneidade

Os resultados do teste de homogeneidade realizado com os itens de ensaio do lote de *Staphylococcus aureus*, está apresentado na [Tabela 1](#). 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.g⁻¹.

Item de Ensaio	Lote de <i>Staphylococcus aureus</i>			
	Contagem		Log ₁₀	
	A	B	A	B
1	1800	1800	3,26	3,26
2	1600	1300	3,20	3,11
3	1400	2200	3,15	3,34
4	1100	700	3,04	2,85
5	900	1500	2,95	3,18
6	2800	700	3,45	2,85
7	1800	1400	3,26	3,15
8	1200	600	3,08	2,78
9	2100	1700	3,32	3,23
10	3200	2100	3,51	3,32

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

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

Lote	Média	σ_p	σ_{all}^2	s_{an}^2	s_{sam}^2	c	Resultado
<i>S. aureus</i>	3,16	0,25	0,00563	0,03207	0,00678	0,04297	Homogeneidade Suficiente

De acordo com os resultados apresentados, o lote foi considerado suficientemente homogêneo.

5.2. Avaliação da Estabilidade¹

No decorrer do EP, foram avaliadas as flutuações temporais nas concentrações de *S. aureus* na temperatura de referência (-70°C). A avaliação da estabilidade de longa duração está apresentada na [Tabela 3](#).

Tabela 3: Avaliação da estabilidade, todos os valores em Log₁₀ UFC.g⁻¹.

Parâmetro	Valor
Média da homogeneidade (\bar{x}_{homo})	3,163
Incerteza da homogeneidade ($x_{\bar{x}_{homo}}$)	0,082
Média dos resultados da estabilidade (\bar{x}_{estab})	3,354
Incerteza da estabilidade ($x_{\bar{x}_{estab}}$)	0,053
$ \bar{x}_{homo} - \bar{x}_{estab} $	0,191
s^*	0,333
$0,3 \times s^*$	0,100
$2 \times \sqrt{x_{\bar{x}_{homo}}^2 + x_{\bar{x}_{estab}}^2}$	0,196
$0,3 \times s^* + 2 \times \sqrt{x_{\bar{x}_{homo}}^2 + x_{\bar{x}_{estab}}^2}$	0,296

¹ Para maiores esclarecimentos, verificar o anexo B deste relatório.

Os resultados indicam que a incerteza devido à instabilidade deverá ser somada ao desvio padrão alvo deste ensaio de proficiência para minimizar seus efeitos. O microrganismo não foi estável a 35°C.

Considerando os resultados obtidos nos estudos de estabilidade, a coordenação do EP enviou os itens de ensaio em caixas contendo gelo seco e estabeleceu o prazo de até 72 horas para o recebimento dos materiais nos laboratórios participantes. Também orientou os laboratórios quanto ao armazenamento dos itens de ensaio em freezer até o momento da análise.

6. Atribuição do Valore Designado

O valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, estão apresentados na [Tabela 4](#).

Tabela 4: Valor designado (x^*), desvio padrão (s^*), incertezas do valor designado ($\text{Log}_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$).

	x^*	s^*	$s^*(\%)$	u_c	k	U	$DPA_{(EP)}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,195	0,333	10,4	0,089	2,13	0,19	0,347

$DPA = s^* + \text{incerteza da instabilidade.}$

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Vinte e três laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 28^a Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango - e todos enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, três (13,0%) são acreditados na norma [ISO/IEC 17025](#) e quatro laboratórios (17,4 %) encontram-se em processo de acreditação na norma citada.

Quanto à natureza do laboratório, vinte e um (91,3%) são governamentais (Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacens) ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. Dois laboratórios privados completam a lista de participantes. A [Tabela 7](#) 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 5](#) 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](#). Neste gráfico, a linha central representa o valor designado e as linhas pontilhadas o intervalo da incerteza expandida (U) do valor designado.

Tabela 5: Resultados por análise e metodologia empregada.

Código dos Laboratórios	Estafilococos Coagulase Positiva		Metodologias ⁽¹⁾
	Número do Item	Resultados (UFC.g ⁻¹)	
MIB 28/301	020	2600	APHA
MIB 28/302	022	2,6 x 10 ³	APHA
MIB 28/303	011	1,02 x 10 ³	APHA
MIB 28/305	004	4,3 x 10 ²	Outros
MIB 28/310	007	1240	APHA
MIB 28/314	009	2 x 10 ³	APHA
MIB 28/316	002	6 x 10 ²	APHA
MIB 28/322	008	3,95 x 10 ³ ± 8,03 x 10 ²	Outros
MIB 28/325	018	Ausência	APHA
MIB 28/329	006	3,2 x 10 ³	BAM
MIB 28/332	001	2,0 x 10 ²	Outros
MIB 28/334	010	1,4 x 10 ³	APHA
MIB 28/336	016	2,2 x 10 ³	APHA
MIB 28/337	013	4,2 x 10 ³	BAM
MIB 28/338	015	3,0 x 10 ³	BAM
MIB 28/341	021	2,5 x 10 ³	APHA
MIB 28/355	014	2600	APHA
MIB 28/360	019	1,5 x 10 ³	APHA
MIB 28/386	005	2 x 10 ³	APHA
MIB 28/388	023	1540	BAM
MIB 28/390	003	350	APHA
MIB 28/391	012	8,1 x 10 ²	Outros
MIB 28/396	017	1300	APHA

(1) APHA[®] → Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4º edição. American Public Health Association. (APHA), 2001;

BAM → Bacteriological Analytical Manual (BAM). U.S.: Food and Drug Administration. 8th edition. 2016.

Outros:

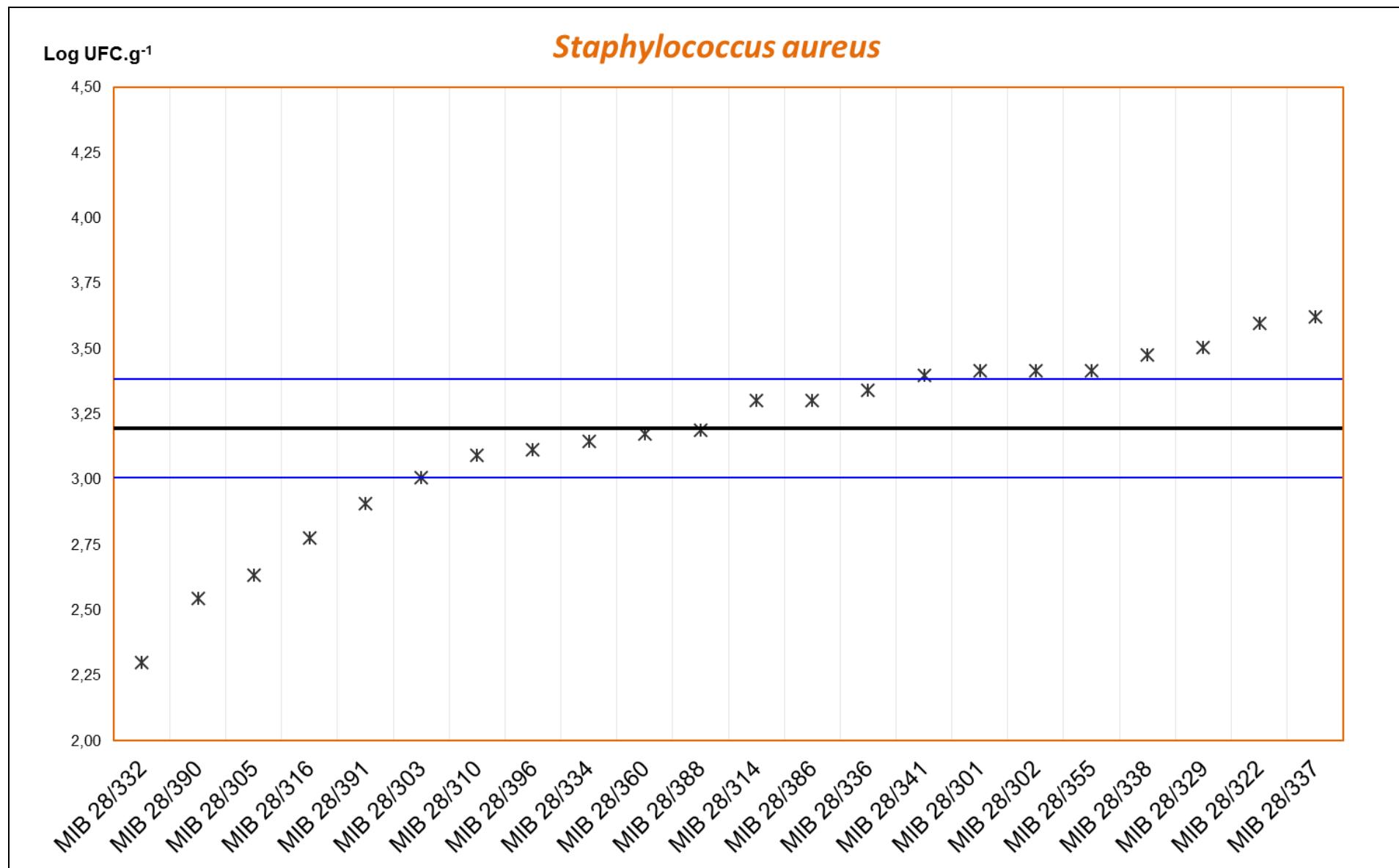
ISO 6888 → Microbiology of food and animal feeding stuffs; 1999;

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

AOAC → Official Methods of Analysis, 20th ed. Staphylococcus, chapter 17, 2016.

IN62 → Instrução Normativa 62.

Figura 1: Dispersão dos resultados: *Staphylococcus aureus*



7.3. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 1), está apresentada na [Tabela 6](#).

Tabela 6: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes.

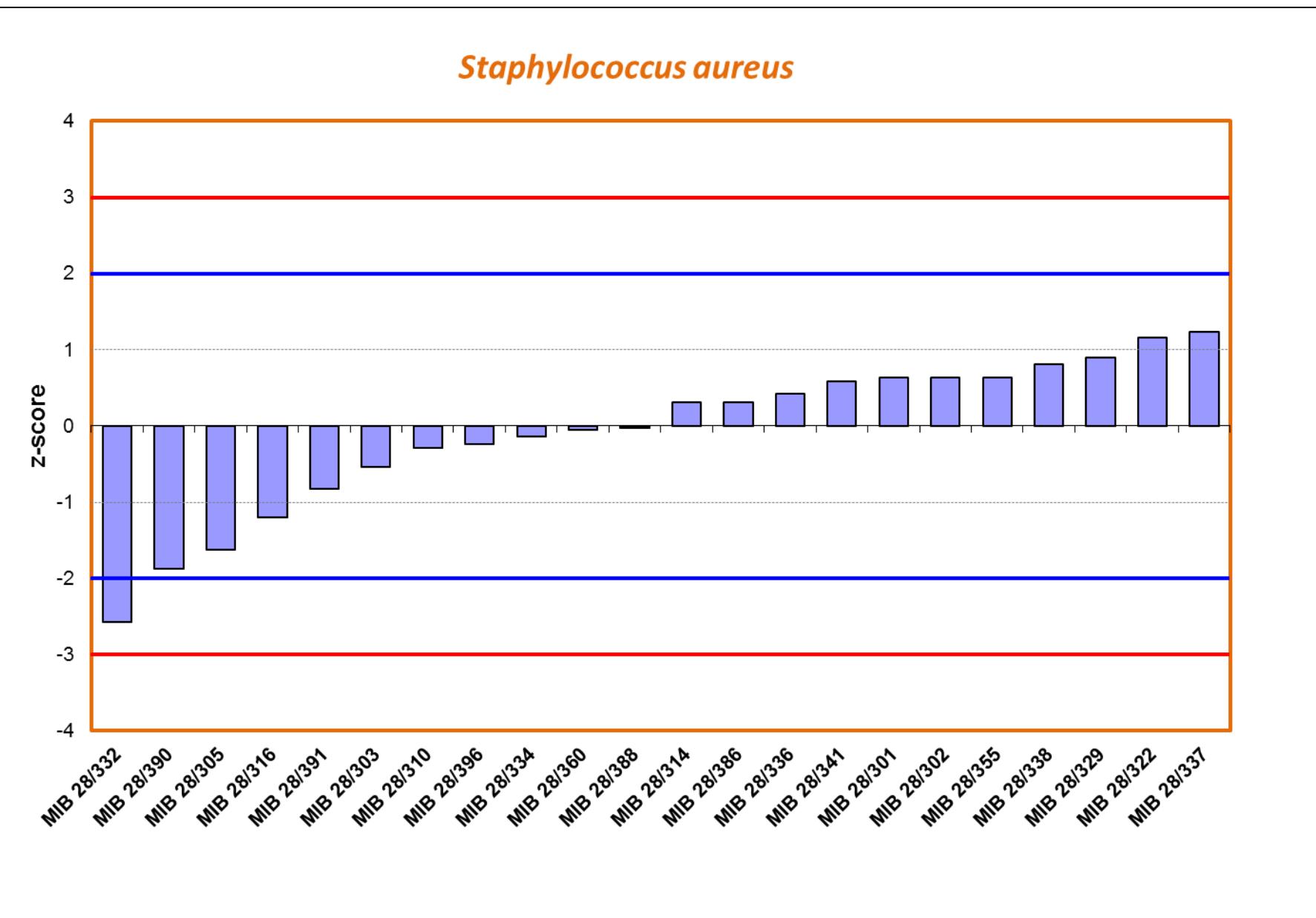
Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (UFC.mL ⁻¹)	Índice z
MIB 28/301	020	2600	0,6
MIB 28/302	022	$2,6 \times 10^3$	0,6
MIB 28/303	011	$1,02 \times 10^3$	-0,5
MIB 28/305	004	$4,3 \times 10^2$	-1,6
MIB 28/310	007	1240	-0,2
MIB 28/314	009	2×10^3	0,3
MIB 28/316	002	6×10^2	-1,2
MIB 28/322	008	$3,95 \times 10^3 \pm 8,03 \times 10^2$	1,1
MIB 28/325	018	Ausência	N.A
MIB 28/329	006	$3,2 \times 10^3$	0,8
MIB 28/332	001	$2,0 \times 10^2$	-2,5
MIB 28/334	010	$1,4 \times 10^3$	-0,1
MIB 28/336	016	$2,2 \times 10^3$	0,4
MIB 28/337	013	$4,2 \times 10^3$	1,2
MIB 28/338	015	$3,0 \times 10^3$	0,8
MIB 28/341	021	$2,5 \times 10^3$	0,5
MIB 28/355	014	2600	0,6
MIB 28/360	019	$1,5 \times 10^3$	0,0
MIB 28/386	005	2×10^3	0,3
MIB 28/388	023	1540	0,0
MIB 28/390	003	350	-1,8
MIB 28/391	012	$8,1 \times 10^2$	-0,8
MIB 28/396	017	1300	-0,2

N.A. = Não Avaliado; Em azul, resultados questionáveis.

A [Figura 2](#) apresenta o resultado de índice z obtido pelos laboratórios participantes para o item de ensaio. O índice z foi calculado apenas para os laboratórios que enviaram resultados numéricos. O laboratório que não observou crescimento, não foi considerado para o cálculo de z-score e teve o resultado considerado **insatisfatório**.

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: *Staphylococcus aureus*



8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- Vinte e dois laboratórios enviaram os resultados expressos numericamente e entre eles vinte e um atingiram o valor de índice $z \leq 121$, considerados **satisfatórios**, e um laboratório foi considerado **questionável**. O laboratório que enviou o resultado como “ausência” foi considerado **insatisfatório**;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Quinze (65,2%) dos laboratórios participantes utilizaram como metodologia o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 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. Modificações em Relação a Versão Anterior

Ocorreu um problema no cálculo do valor designado e do desvio padrão alvo por conta de um erro de transcrição de parte da coordenação deste EP. Assim, os resultados tiveram que ser recalculados e foram modificados os seguintes itens: Tabelas 3, 4 e 6; Figuras 1 e 2; e a avaliação dos laboratórios no tópico 8.

11. 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 Ensaios 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.

12. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 7](#).

Tabela 7: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 28ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Frango.

Laboratórios Participantes
Análises Físico-Químicas de Alimentos
Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo de Ribeirão Preto VI
IAL Araçatuba
IBERPHARM Laboratórios do Brasil LTDA
Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Bauru - Laboratório de Microbiologia Alimentar
Instituto Adolfo Lutz – CLR Sorocaba XI
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 Central Noel Nutels
Laboratório de Enterotoxinas de Alimentos do Lacen/MG
Laboratório de Microbiologia Alimentar
Laboratório de Microbiologia Alimentar – Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos
Laboratório Municipal de Saúde Pública – LASP
Laboratório Municipal de Saúde Pública Dr. Jefferson Ignácio de Araújo
Laboratório Quimioambiental LTDA
Lacen/CE
Núcleo de Microbiologia / Instituto Adolfo Lutz
Seção de Microbiologia de Alimentos – Lacen/PR
Seção de Microbiologia de Alimentos e Água – Lacen GO
Seção/Laboratório de Microbiologia/Lacen/CEVS/SES-RS
Setor de Microbiologia de Alimentos/Laboratório Central de Saúde Pública, Lacen SC

- Total de participantes: 23 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 dez itens de ensaio. Os frascos foram analisados sob condições de repetitividade. Dos frascos representantes do lote, após a reconstituição dos liófilos, 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, 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 $F_1 = \frac{\chi^2_{m-1; 0,95}}{(m-1)}$ 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 – Estabilidade Segundo a Norma ISO 13528

Procedimento (B.4.2.3, da norma) para uma verificação de estabilidade usando medidas antes e depois de uma proficiência:

- a) Selecionar aleatoriamente um número $2g$ de itens ensaio de proficiência, onde $g \geq 2$;
- b) Selecionar um único laboratório usando um único método de medição com boa precisão intermediária;
- c) Medir os g itens de ensaio antes da data planejada de distribuição aos participantes. As medidas replicatas devem ser feitas em uma ordem inteiramente aleatória;

Nota: Este grupo de medições pode ser substituído pelos resultados do estudo de homogeneidade (B.4.2.4).

- d) Reservar os g itens de ensaio restantes em condições similares às condições de armazenamento esperado nas instalações dos participantes;
- e) Após a data de encerramento do envio dos resultados dos participantes, medir os g itens de ensaio remanescentes, usando o mesmo laboratório, método de medição e número de repetições em a) acima, com todas as repetições em uma ordem aleatória.
- f) Calcule as médias dos dois grupos de resultados;
- g) **A diferença, em módulo, das médias não pode ser maior que 0,3 desvio padrão alvo para o ensaio de proficiência.**

Nota: Caso este critério não seja atendido, uma possibilidade é adicionar a incerteza da diferença das médias (item f), ao desvio padrão alvo (B.5.2.c).

Neste EP, temos:

- 1º grupo de medidas (c), estudo de homogeneidade;
 - 2º grupo de medidas, 4 itens de ensaio medidos em duplicatas;
- Desvio padrão alvo para o ensaio de proficiência, s^* ;

Condição para a homogeneidade:

$$|\bar{x}_{homo} - \bar{x}_{estab}| \leq 0,3 \times s^* + 2 \times \sqrt{x_{\bar{x}_{homo}}^2 + x_{\bar{x}_{estab}}^2} \quad (1)$$

Anexo C – 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.

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

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

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**.

² 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.

³ 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



INCQS

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