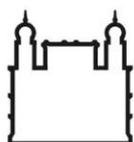


**Ensaio de Proficiência em Produtos
Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária
(EP/INCQS)**

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia
de Alimentos 32ª Rodada –
Contagem de Estafilococos Coagulase
Positiva em Queijo**

EP MIB 32/18



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 32ª Rodada –
Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijo**

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
Catia Aparecida Chaia de Miranda
Ingrid Camelo da Silva
Jandira Corrêa dos Santos
Marcelo Luiz Lima Brandão
Mariana Gonçalves Coelho de Azevedo
Nathalia Gonçalves Santos Caldeira
Silvia Maria dos Reis Lopes
Valéria de Mello Medeiros

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	5
3.7. Análise dos Itens de Ensaio.....	5
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.....	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. Referências Bibliográficas	15
11. Laboratórios Participantes	16
Anexo A – Homogeneidade Segundo o Protocolo Harmonizado	17
Anexo B – Valor Designado Segundo a Norma ISO 13528	19

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 32ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijo - 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 Queijo, 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

O queijo tipo Minas Frescal é um produto tipicamente nacional, de tecnologia simples e de larga aceitação no país. Por ser um alimento de pronto consumo, e indicado para idosos, gestantes e convalescentes, inclusive em dietas hospitalares, a sua inocuidade é de suma importância para que estes produtos não venham a causar riscos à saúde do consumidor.

Logo, a qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados para o controle microbiológico desta matriz nestes laboratórios são de suma importância para que não causem danos à saúde do consumidor.

3.2. Preparo do Item de Ensaio

Para este EP foi preparado um lote de item de ensaio e foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* identificada como P4283 depositada na “Coleção de Pesquisa 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 $3,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹.

3.4. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

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

Foram realizados os estudos de estabilidade de armazenamento e de referência.

Para o estudo de longa referência, foi feito o controle de estoque a -70°C (temperatura de referência - *ultrafreezer*), e o estudo de armazenamento foi realizado em temperatura $< -10^{\circ}\text{C}$.

O teste da estabilidade na temperatura de referência foi iniciado após o preparo do lote e abrangeu 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 32ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijo - foi enviado 1 (um) frasco contendo o micro-organismo liofilizado. 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

Para se avaliar a estabilidade da concentração de *S. aureus* na matriz em função do tempo (referência e armazenamento), 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 *S. aureus* foi considerada estável 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_{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 quase 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 líófilo, 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	Contagem		Log ₁₀	
	A	B	A	B
1	1200	2000	3,08	3,30
2	3000	2900	3,48	3,46
3	1800	1800	3,26	3,26
4	2300	3100	3,36	3,49
5	2300	2600	3,36	3,41
6	3400	2300	3,53	3,36
7	1900	2500	3,28	3,40
8	2400	2300	3,38	3,36
9	2800	3000	3,45	3,48
10	4900	3000	3,69	3,48
11	1800	2800	3,26	3,45
12	2300	3400	3,36	3,53
13	1300	1100	3,11	3,04
14	1500	3600	3,18	3,56
15	2100	1500	3,32	3,18
16	1300	2100	3,11	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 \log_{10} UFC.g⁻¹.

Lote	Média	σ_p	σ_{all}^2	s_{an}^2	s_{sam}^2	c	Resultado
<i>S. aureus</i>	3,35	0,25	0,00563	0,01372	0,00944	0,01865	Homogeneidade Suficiente

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

5.2. Avaliação da Estabilidade

No decorrer do EP, foram avaliadas as flutuações temporais nas concentrações de *S. aureus* na temperatura de referência (-70°C) e de armazenamento (< -10°C). A avaliação da estabilidade de longa duração está apresentada na [Tabela 3](#). A [Tabela 4](#) apresenta os resultados estatísticos.

Tabela 3: Estudo de estabilidade nas diferentes temperaturas (Replicatas em UFC.g⁻¹; log das médias em Log₁₀ UFC.g⁻¹).

Dias	Referência (-70°C)			Dias	Armazenamento (< -10°C)		
	Replicata 1	Replicata 2	Log das Médias		Replicata 1	Replicata 2	Log das Médias
0	2269	2500	3,38	0	2269	2500	3,38
8	3200	3900	3,55	8	1700	2900	3,35
22	2500	2700	3,41	14	1100	2400	3,21
35	3600	3200	3,53	22	3500	1600	3,37
42	1500	1500	3,18	35	2300	1700	3,30
67	4900	5650	3,72	42	1300	500	2,91
134	4100	7000	3,73				

Tabela 4: Análise de Regressão - Diferentes estudos de estabilidade, em Log₁₀ UFC.g⁻¹.dias⁻¹.

Lote de <i>Staphylococcus aureus</i>	Coeficiente Angular	Erro Padrão	Intervalo de Confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Referência	0,002544	0,001561	-0,001469	0,006557	Estável
Armazenamento	-0,007797	0,004027	-0,018978	0,003385	Estável

Os itens de ensaio foram considerados estáveis nas duas condições de estudo e adequados a serem usados nesta rodada.

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 Valor Designado

O valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, estão apresentados na [Tabela 5](#).

Tabela 5: Valor designado (x^*), desvio padrão (s^*), incertezas do valor designado ($\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$).

	x^*	s^*	$s^*(\%)$	u_c	k	U	$\text{DPA}_{(\text{EP})}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,16	0,40	12,6	0,11	2,13	0,23	0,40

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

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Vinte e seis laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 32ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijo - e [vinte e três](#) (88,5%) 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 outros três laboratórios (13,0 %) encontram-se em processo de acreditação na norma citada.

Quanto à natureza do laboratório, dezenove (82,6 %) são governamentais (Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacs) ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. Quatro laboratórios privados completam a lista de participantes. A [Tabela 8](#) 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 6](#) 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 6: Resultados por análise e metodologia empregada.

Código dos Laboratórios	Estafilococos Coagulase Positiva		Metodologias ⁽¹⁾
	Número do Item	Resultados (UFC.g ⁻¹)	
MIB 32/104	49	1800	ISO
MIB 32/105	43	0,028	APHA
MIB 32/109	46	1900	ISO
MIB 32/110	38	5300000	Outros
MIB 32/115	32	1400	BAM
MIB 32/124	15	1720	APHA
MIB 32/128	48	27	APHA
MIB 32/129	10	3000	APHA
MIB 32/130	26	1800	BAM
MIB 32/134	14	2100	APHA
MIB 32/139	39	2700	APHA
MIB 32/147	30	1200	APHA
MIB 32/159	25	2700	BAM
MIB 32/162	22	2400	APHA
MIB 32/168	35	900	APHA
MIB 32/173	28	2000	APHA
MIB 32/174	23	600	APHA
MIB 32/182	27	11	ISO
MIB 32/189	42	1400	ISO
MIB 32/194	34	2980	APHA
MIB 32/195	05	190	APHA
MIB 32/199	44	3800	APHA
MIB 32/200	37	170	Outros

(1) APHA® → *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association. (APHA), várias edições;

BAM → Bacteriological Analytical Manual (BAM). U.S.: Food and Drug Administration, várias edições.

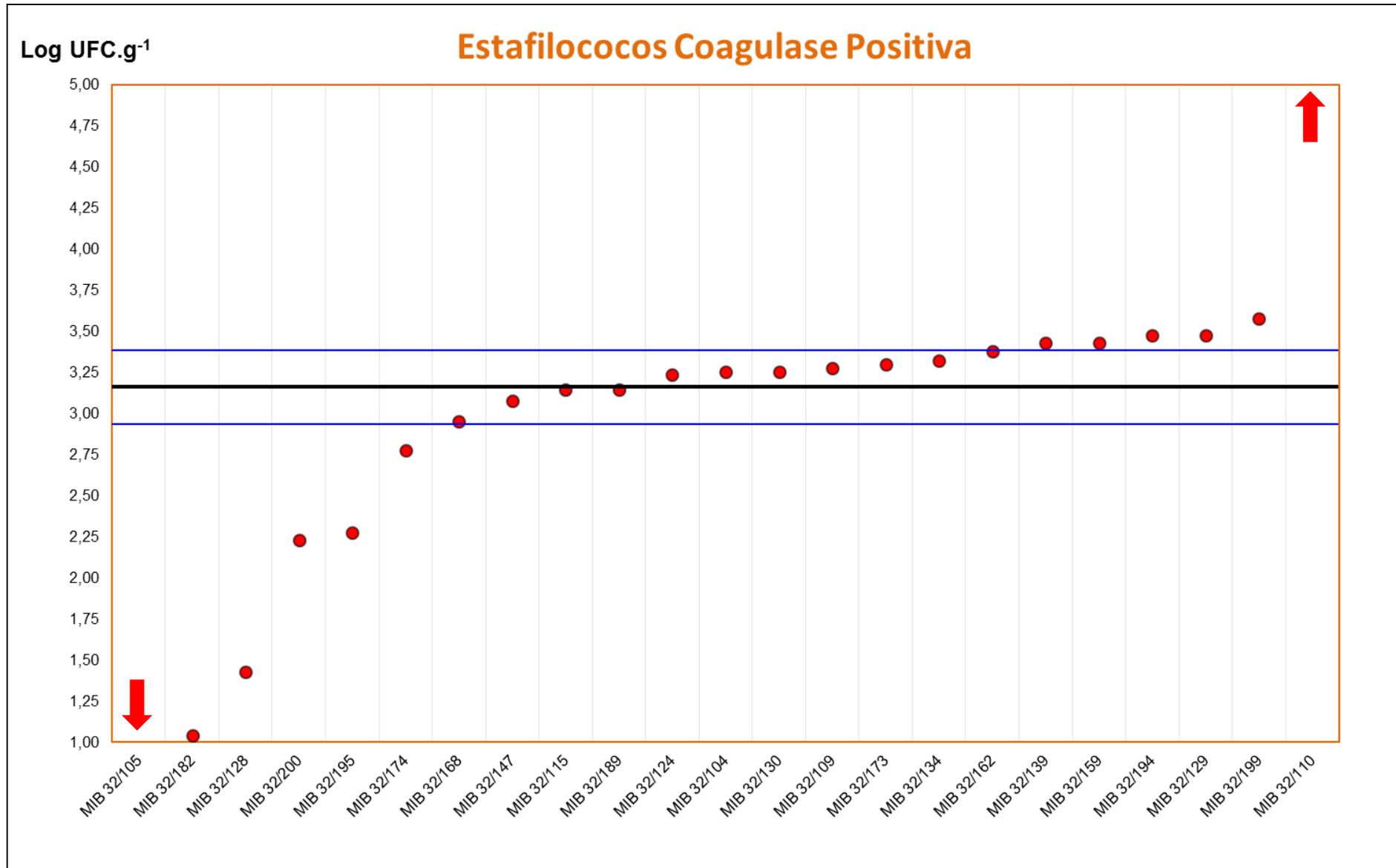
ISO 6888 → Microbiology of food and animal feeding stuffs; 2003, 2016;

Outros:

Contagem Direta- Semeadura em Superfície/ICMSF/2000;

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

Figura 1: Dispersão dos resultados: Estafilococos Coagulase Positiva



7.3. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 1), está apresentada na [Tabela 7](#).

Tabela 7: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes.

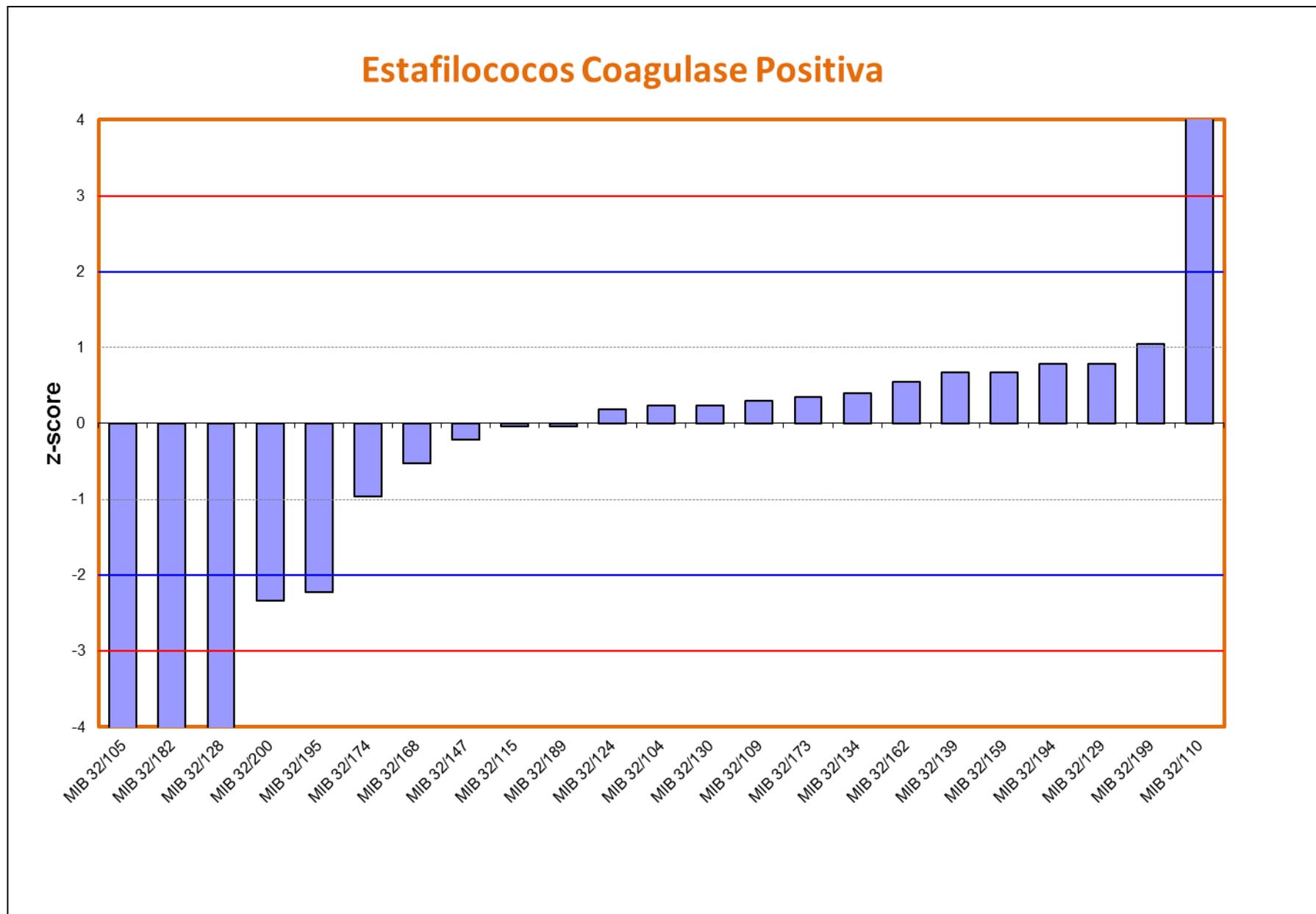
Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (UFC.mL ⁻¹)	Índice z
MIB 32/104	49	1800	0,2
MIB 32/105	43	0,028	-11,8
MIB 32/109	46	1900	0,2
MIB 32/110	38	5300000	8,9
MIB 32/115	32	1400	0,0
MIB 32/118	19	Não enviado	-
MIB 32/119	04	Não enviado	-
MIB 32/124	15	1720	0,1
MIB 32/128	48	27	-4,3
MIB 32/129	10	3000	0,7
MIB 32/130	26	1800	0,2
MIB 32/134	14	2100	0,4
MIB 32/139	39	2700	0,6
MIB 32/147	30	1200	-0,2
MIB 32/159	25	2700	0,6
MIB 32/162	22	2400	0,5
MIB 32/168	35	900	-0,5
MIB 32/173	28	2000	0,3
MIB 32/174	23	600	-0,9
MIB 32/175	16	Não enviado	-
MIB 32/182	27	11	-5,3
MIB 32/189	42	1400	0,0
MIB 32/194	34	2980	0,7
MIB 32/195	05	190	-2,2
MIB 32/199	44	3800	1,0
MIB 32/200	37	170	-2,3

Em **vermelho**, resultados insatisfatórios e 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: Estafilococos Coagulase Positiva



8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- Vinte e três laboratórios enviaram os resultados expressos numericamente e entre eles dezessete atingiram o valor de índice $z \leq |2|$, considerados **satisfatórios**, dois laboratórios foram considerados **questionáveis** e quatro laboratórios foram considerados **insatisfatórios**;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Quatorze (60,9%) 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. 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**.

BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. Staphylococcus aureus. In: BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL Manual Online; FDA, 2001. Chapter 12.

BRASIL. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, n. 7-E, p.45, 10 jan. **2001**. 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.

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

11. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 8](#).

Tabela 8: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 32ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Queijo.

Laboratórios Participantes
Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo de Ribeirão Preto VI
Centro de Laboratório Regional XII – Taubaté
IAL – Centro de Laboratório Regional de Bauru
IAL – CRL Araçatuba I
IBERPHARM Laboratórios do Brasil LTDA
Instituto Adolfo Lutz – CLR VIII Santo André
LAAE – Laboratório De Análises de Água e Efluentes LTDA
Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas – Lacen/AL
Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás – Lacen/GO
Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso – Lacen/MT
Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul – Lacen/MS
Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais – FUNED
Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina – Lacen/SC
Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará – Lacen/CE
Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – Lacen/DF
Laboratório Central de Saúde Pública do Pará – Lacen/PA
Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Norte – Lacen/RN
Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantis – Lacen/TO
Laboratório de Microbiologia/Lacen/CEVS/SES-RS
Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos – IMA
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL
Prefeitura Municipal de Guarulhos
SUBVISA/RJ

- 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 dezesseis 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 16.

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 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^*)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.

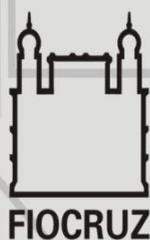
Em seguida, calculou-se novamente o valor de F_i , os novos valores superiores e inferiores, conforme descrito, respectivamente, nas Equações 3, 4 e 5, sendo os valores discrepantes substituídos pelos novos limites. Este procedimento corresponde a outro ciclo ou **Ciclo 1**.

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 significativa 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 (desvio padrão alvo do EP).

Para a incerteza do valor designado descrito, foi 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 foi 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