

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

Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 36^a Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite

EP MIB 36/19



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz





**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 36ª Rodada –
Contagem de *Bacillus cereus* em Leite**

RELATÓRIO FINAL – REVISÃO 1

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

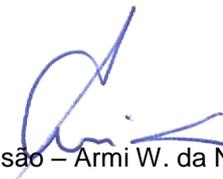
COMISSÃO ORGANIZADORA DA RODADA

- 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
Jandira Corrêa dos Santos
Jéssica Soldani Couto
Mariana Gonçalves Coelho de Azevedo
Nathalia Gonçalves Santos Caldeira
Sílvia Maria dos Reis Lopes
Valéria de Mello Medeiros


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

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Objetivos	3
3. Produção dos Itens de Ensaio	4
3.1. Escolha da Matriz	4
3.2. Preparo do Item de Ensaio	4
3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio	4
3.4. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio	4
3.5. Recebimento do Item de Ensaio	5
3.6. Análise dos Itens de Ensaio	5
4. Tratamento dos Resultados	5
4.1 Valor Designado (\bar{x}) e suas Incertezas ($u_{\bar{x}}$)	5
4.2 Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência	5
4.3 Índice z	5
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio	6
6. Atribuição do Valore Designado	6
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes	7
7.1. Laboratórios Participantes	7
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes	7
7.3. Cálculo do Índice z'	9
8. Conclusões e Comentários	12
9. Confidencialidade	12
10. Modificações em Relação a Versão Anterior	12
11. Referências Bibliográficas	13
12. Laboratórios Participantes	14

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 36ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite - 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 *Bacillus cereus* em Leite, 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 matriz leite foi selecionada para este EP por ser um alimento de elevado consumo pela população brasileira, principalmente por crianças e idosos.

3.2. Preparo do Item de Ensaio

Para este EP foi preparado um lote de item de ensaio. Foi utilizada uma cepa de *Bacillus cereus* identificada como P3441 e depositada na “Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”.

3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Vinte e dois itens de ensaio 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 avaliação da homogeneidade foi realizada utilizando o procedimento descrito no [Protocolo Harmonizado](#) e a avaliação das estabilidades o procedimento descrito na [ABNT ISO GUIA 35](#).

3.4. 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 36ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite - foram enviados 2 (dois) frascos contendo o micro-organismo liofilizado. O item foi lacrado e identificado 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, acondicionado em recipiente apropriado. Além disso, o recipiente foi colocado dentro de uma caixa de isopor contendo gelo seco, devidamente lacrada e identificada, para que a integridade do conteúdo fosse mantida durante o transporte.

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

3.5. 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**”.

3.6. Análise dos Itens de Ensaio

Os laboratórios participantes foram orientados a realizar as análises para contagem de *Bacillus cereus* 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

4.1 Valor Designado (\hat{x}) e suas Incertezas ($u_{\hat{x}}$)

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.

4.2 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 em função dos resultados dos participantes, usando o algoritmo A do anexo C desta norma. Contudo, caso este valor fosse superior ao estipulado no [protocolo da rodada](#), critério 6 do item 12, **este último seria o utilizado**.

4.3 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.

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

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

Os resultados destes dois estudos demonstraram que o lote de *Bacillus cereus* apresentou-se homogêneo e estável para a presença deste micro-organismo.

6. Atribuição do Valor Designado

O valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, estão apresentados na [Tabela 1](#). Em vermelho os valores utilizado para a avaliação dos laboratórios.

Tabela 1: Valor designado (x^*), desvio padrão (s^*), incertezas do valor designado (Log₁₀ UFC.g⁻¹).

	x^*	s^*	u_c	k	U	$s'_{(EP)}$
<i>Bacillus cereus</i>	4,363	0,152	0,046	2,17	0,10	0,16

A incerteza do valor designado não pode ser negligenciada visto que não atende ao critério de ser menor que $0,3.s^*$, assim, esta incerteza será somada ao desvio padrão alvo e os laboratórios serão avaliados em função do z' . A fórmula do z' bem como os critérios de avaliação estão descritos abaixo:

$$z' = \frac{x_i - x^*}{s'_{(EP)}} \quad (2)$$

Onde x_i representa o valor do laboratório participante, x^* representa o valor designado (média robusta) e $s'_{(EP)}$ o desvio padrão para o ensaio de proficiência.

$$\text{Sendo: } s'_{(EP)} = \sqrt{(s^*)^2 + (u_c)^2} \quad (3)$$

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

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 36ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite. Dezesete (77,3%) enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, três (17,6%) são acreditados na norma [ABNT SO/IEC 17025](#) e um laboratório (5,9 %) encontra-se em processo de acreditação na norma citada.

Quanto à natureza do laboratório, quinze (88,2%) são governamentais, sendo 14 (82,4%) Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacens ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. Dois laboratórios privados completam a lista de participantes. A [Tabela 4](#) 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 [ABNT ISO/IEC 17043](#). A [Tabela 2](#) apresenta os resultados e a metodologia empregada.

O gráfico da dispersão dos resultados 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 2: Resultados por análise e metodologia empregada.

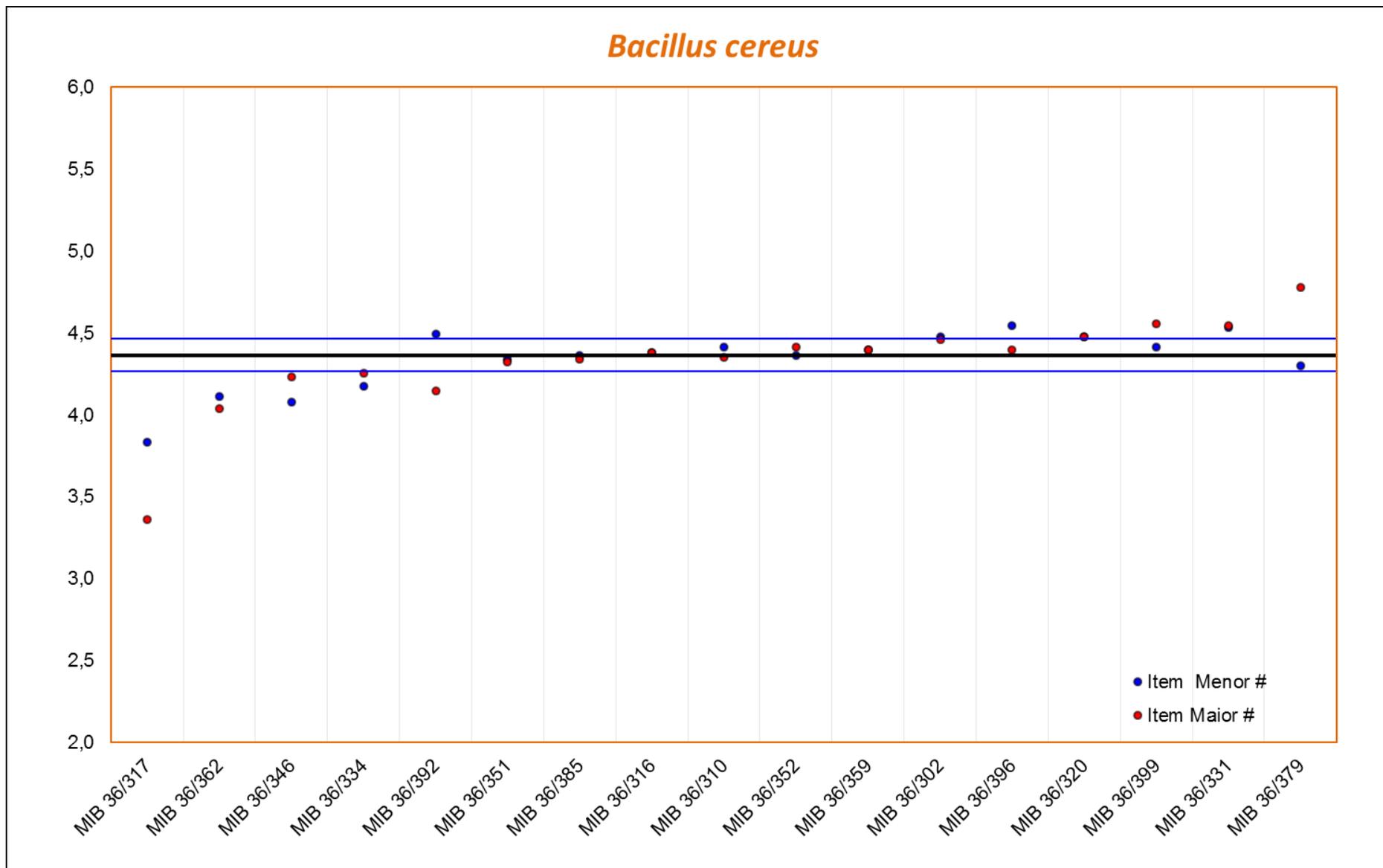
Código dos laboratórios	<i>Bacillus cereus</i>				Metodologias ¹
	Item #	Resultado (UFC.g ⁻¹)	Item #	Resultado (UFC.g ⁻¹)	
MIB 36/302	#02	30000	#58	29000	APHA
MIB 36/310	#01	26000	#50	22500	APHA
MIB 36/316	#46	24000	#56	24000	APHA
MIB 36/317	#08	6800	#23	2300	APHA
MIB 36/320	#37	30000	#41	30000	APHA
MIB 36/331	#49	34000	#52	35000	BAM
MIB 36/334	#26	15000	#39	18000	ISO 7932
MIB 36/346	#17	12000	#53	17000	APHA
MIB 36/351	#43	22000	#54	21000	BAM
MIB 36/352	#31	23000	#59	26000	BAM
MIB 36/359	#14	25000	#48	25000	APHA
MIB 36/362	#07	13000	#51	11000	ISO 7932
MIB 36/379	#29	20000	#40	60000	APHA
MIB 36/385	#10	23000	#60	22000	APHA
MIB 36/392	#42	31000	#47	14000	BAM
MIB 36/396	#09	35000	#38	25000	APHA
MIB 36/399	#44	26000	#45	36000	APHA

(1) APHA® → Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 5th edition. American Public Health Association, Washington, D. C., 2015. Chapter 31, p.375-390;

BAM® → Bacteriological Analytical Manual Online Version: Chapter 14: *Bacillus cereus*. 8. ed. Arlington: FDA, 2012;

ISO 7932 → Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 degrees C.

Figura 1: Dispersão dos resultados: *Bacillus cereus*



7.3. Cálculo do Índice z'

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z' (Equação 1), está apresentada na [Tabela 3](#).

Tabela 3: Valores do índice z' obtidos pelos laboratórios participantes.

Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (UFC.g ⁻¹)	Índice z'	Número do Item	Resultados (UFC.g ⁻¹)	Índice z'
MIB 36/302	#02	30000	0,7	#58	29000	0,6
MIB 36/310	#01	26000	0,3	#50	22500	0,0
MIB 36/316	#46	24000	0,1	#56	24000	0,1
MIB 36/317	#08	6800	-3,3	#23	2300	-6,3
MIB 36/320	#37	30000	0,7	#41	30000	0,7
MIB 36/331	#49	34000	1,0	#52	35000	1,1
MIB 36/334	#26	15000	-1,1	#39	18000	-0,6
MIB 36/346	#17	12000	-1,7	#53	17000	-0,8
MIB 36/351	#43	22000	-0,1	#54	21000	-0,2
MIB 36/352	#31	23000	0,0	#59	26000	0,3
MIB 36/359	#14	25000	0,2	#48	25000	0,2
MIB 36/362	#07	13000	-1,5	#51	11000	-2,0
MIB 36/379	#29	20000	-0,3	#40	60000	2,6
MIB 36/385	#10	23000	0,0	#60	22000	-0,1
MIB 36/392	#42	31000	0,8	#47	14000	-1,3
MIB 36/396	#09	35000	1,1	#38	25000	0,2
MIB 36/399	#44	26000	0,3	#45	36000	1,2

N.C. = Não calculado. Em azul, resultados questionáveis. Em vermelho, resultados insatisfatórios.

As Figuras 2 e 3 apresentam os resultados de índice z' obtido pelos laboratórios participantes para os dois itens de ensaio. O índice z' foi calculado apenas para os laboratórios que enviaram resultados numéricos.

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: *Bacillus cereus* (Item de Ensaio de menor #)

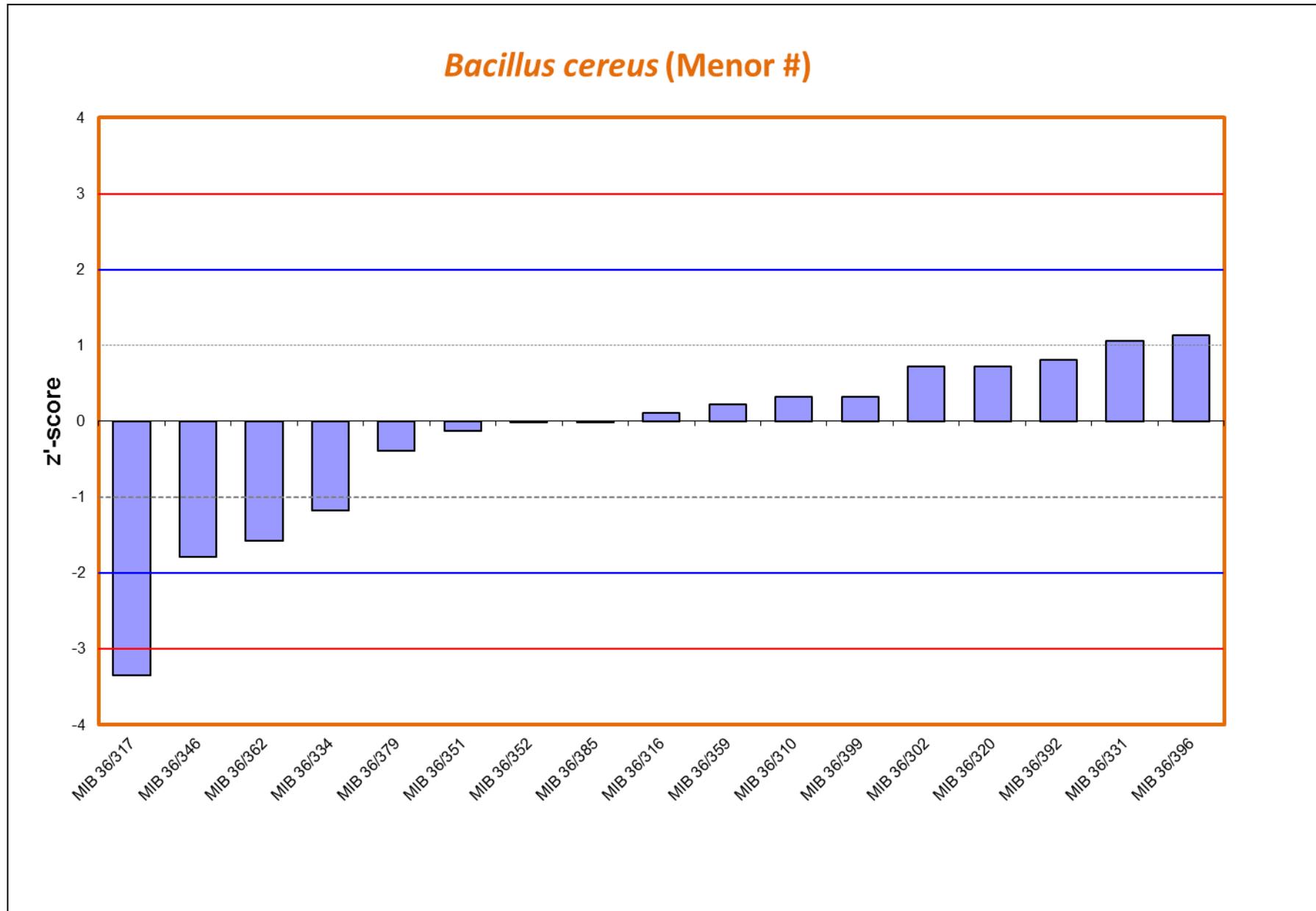
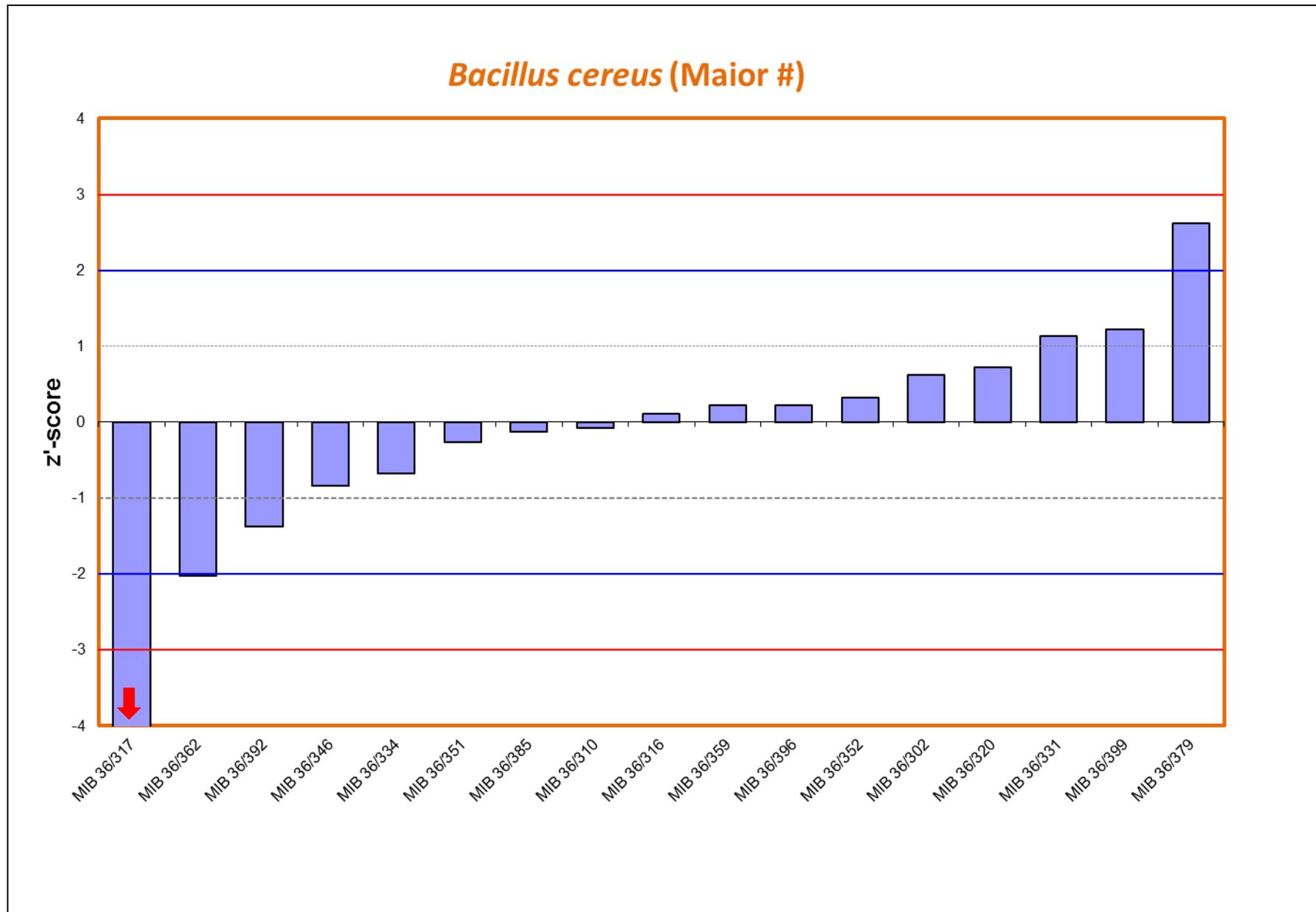


Figura 3: Gráfico de z'-score: *Bacillus cereus* (Item de Ensaio de maior #)



8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O número de laboratórios inscritos neste ensaio de proficiência totalizou vinte e dois. Dezesete (77,3%) encaminharam os resultados até a data prevista no protocolo;
- Dos dezesete laboratórios que enviaram o resultado, quinze (88,2%) atingiram o valor de índice $z' \leq |2|$, considerado **satisfatórios**, um laboratório foi considerado **questionável** e outro laboratório **insatisfatório**;
- De 34 resultados numéricos enviados pelos laboratórios, 31 (91,2%) foram considerados **satisfatórios**;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Onze (64,7%) dos laboratórios participantes utilizaram como metodologia o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, APHA, enquanto os outros utilizaram metodologias diferentes para a análise;
- Para os laboratórios que obtiveram resultados insatisfatórios ou questionáveis, 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

Foi “autorizada a emissão”, página 1 do relatório.

10. Referências Bibliográficas

ABNT ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2017**.

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

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

BRASIL. 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.

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.

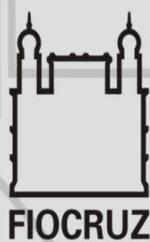
11. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 4](#).

Tabela 4: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 36ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite.

Laboratórios Participantes
<i>Centro de Qualidade Analítica - CQA</i>
<i>Iberpharm Laboratórios do Brasil LTDA</i>
<i>Instituto Adolfo Lutz – CLR Araçatuba</i>
<i>Instituto Adolfo Lutz – CLR Bauru</i>
<i>Instituto Adolfo Lutz – CLR Santos</i>
<i>Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas – Lacen/AL</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás – Lacen/GO</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais – Lacen MG/Funed</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública de Santa Catarina – Lacen/SC</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará – Lacen/CE</i>
<i>Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – Lacen/DF</i>
<i>Laboratório Central Dr. Almino Fernandes – Lacen/RN</i>
<i>Laboratório de Bromatologia – Dir. Visa – SMSBH</i>
<i>Laboratório de Controle Qualidade em Saúde – COVISA</i>
<i>Laboratório de Microbiologia/Lacen/CEVS/SES-RS</i>
<i>Laboratório Municipal de Saúde Pública – Município do Rio de Janeiro SUBVISA/RJ</i>

- Total de participantes: 17 laboratórios
- O código de cada participante **não** está associado à ordem da lista de participantes.



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