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

Ensaio de Proficiência para Determinação de Medicamentos Veterinários Em Alimentos

6ª Rodada – Tetraciclinas em Leite

Rodada EP MVT 06/20

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
INCQS
RILAA INFAL
Red Interamericana de Laboratorios de Análisis de Alimentos
Inter-American Network of Food Analysis Laboratories

Ensaio de Proficiência para Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos 6ª Rodada – Tetraciclinas em leite

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
Margarita Corrales – Secretaria *ex officio* da RILAA (*ad hoc*)

- COMITÊ TÉCNICO

Bernardete Ferraz Spisso
Mararlene Ulberg Pereira
Rosana Gomes Ferreira

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

06/Abril/2021

SUMÁRIO

1. Introdução 3
2. Objetivos 4
3. Produção dos Itens de Ensaio – Material de Referência Certificado 4
3.1. Homogeneidade e Estabilidade dos MRC 5
3.2. Envio dos Itens de Ensaio – Material de Referência Certificado 5
4. Análise dos Resultados 5
4.1. Resultados das Medições dos Laboratórios 5
4.2. Estabelecimento do Valor Certificado 5
4.3. Análise Estatística 5
4.3.1. Avaliação da Estabilidade do Material de Referência Certificado 6
4.3.2. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência 6
4.3.3. Índices z 7
5. Resultados da Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio 7
6. Atribuição do Valor Designado 8
7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes 8
7.1. Laboratórios Participantes 8
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes 8
7.3. Cálculo do Índice z 10
8. Conclusões e Comentários 11
9. Confidencialidade 11
10. Modificações em Relação à Versão Anterior 11
11. Referências Bibliográficas 12
12. Laboratórios Participantes 13

1. Introdução

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

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

Uma avaliação dos níveis residuais de medicamentos veterinários em produtos de origem animal é extremamente importante para referenciar os produtores quanto às boas práticas veterinárias e, caso estas não estejam sendo seguidas, permitir a tomada de medidas preventivas e de controle antes que estes tipos de resíduos químicos afetem o meio ambiente e a saúde da população ou causem graves perdas econômicas. Por ser muito elevado o número de medicamentos veterinários utilizados nos alimentos, por se encontrarem em concentrações muito baixas (da ordem de μg/kg), e também por estarem presentes em uma grande variedade de matrizes, cada uma com suas particularidades, a identificação e a quantificação destas substâncias nos alimentos torna-se extremamente complexa. Não obstante, é crescente a exigência no mercado internacional quanto aos níveis de resíduos e contaminantes em alimentos, cada vez mais reduzidos.

A realização de programas de ensaio de proficiência voltados para a determinação analítica de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos produzidos no Brasil, portanto, é imprescindível para o aumento da confiabilidade dos resultados das medições aqui realizadas, contribui para o monitoramento de agentes nocivos à saúde publica, traz maior confiabilidade aos resultados emitidos, facilita o comércio internacional e previne barreiras técnicas.

Visando a promoção da saúde, o INCQS promoveu o Ensaio de Proficiência para Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos, 6ª Rodada – Tetraciclinas em Leite, seguindo as diretrizes da ABNT ISO/IEC 17043, apresentando neste relatório os resultados da avaliação de desempenho dos laboratórios participantes.

2. Objetivos

O objetivo deste ensaio de proficiência é fornecer aos laboratórios participantes uma ferramenta efetiva para verificar sua competência nos ensaios de identificação e quantificação de tetraciclinas em leite. Este EP também poderá contribuir para:

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

3. Produção dos Itens de Ensaio – Material de Referência Certificado

O MRC foi produzido como requisito para obtenção do grau de mestre em ciências pela pesquisadora Mychelle Alves Monteiro no programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Monteiro, M.A; 2010).

O leite foi a matriz selecionada para a produção do MRC por ser o alimento mais consumido entre as crianças e os idosos e por ser uma das matrizes analisadas nos dois programas nacionais vigentes à época para o controle de resíduos em produtos de origem animal.

Antes da administração do medicamento no animal foi realizada a análise de uma amostra proveniente de uma ordenha do animal para comprovar a isenção de antibióticos no leite.

O MRC foi preparado por inoculação do medicamento Tetraciclina LA/SPV® ao animal de espécie bovina e de raça mestiço de holandês zebu com peso médio de 500kg no curral do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sendo que após 1 h da aplicação foi realizada a ordenha. O leite obtido foi centrifugado a 4500 x g por 5min e a 4ºC para remoção da gordura e armazenado a uma temperatura inferior a -70ºC.

Volumes de 2 mL do leite naturalmente contaminado foram adicionados em frascos de vidro âmbar e em seguida liofilizados e fechados a vácuo. Foram preparados um total de 3 lotes de 116 (cento e dezesseis) frascos cada.

Os procedimentos de preparo dos frascos e as análises foram realizados no Departamento de Química/Setor de Resíduos e Contaminantes/Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários do INCQS/FIOCRUZ. As análises das amostras para as avaliações de homogeneidade, estabilidade e caracterização, bem como do monitoramento da estabilidade, foram realizadas segundo os requisitos da norma ABNT ISO/IEC 17025 para a análise de resíduos de medicamentos veterinários.

3.1. Homogeneidade e Estabilidade dos MRC

Foram separados aleatoriamente 16 (dezesseis) frascos de cada lote produzido, representativos do conjunto preparado, para o teste de homogeneidade. O item de ensaio foi dividido em duas partes, que foram analisadas de forma independente.

Este material foi armazenado em condições diferentes, simulando temperatura de transporte, temperatura de armazenamento em geladeira, temperatura de armazenamento em freezer e em ultra freezer.

Os testes estatísticos foram feitos segundo a ABNT ISO GUIA 35.

Os resultados obtidos nos testes estão apresentados no item 5 deste relatório.

3.2. Envio dos Itens de Ensaio – Material de Referência Certificado

Para cada laboratório inscrito na 6ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Medicamentos Veterinários – Tetraciclinas em Leite foram enviados dois itens de ensaio contendo, cada um, cerca de 2,0 ± 0,1mL de leite liofilizado. Um frasco com leite antes da inoculação (isento da tetraciclina adicionada) e outro após a inoculação.

Todo o material foi armazenado em ultra freezer (< -70 °C) até o momento em que foram enviados aos laboratórios participantes. O envio aos laboratórios nacionais foi realizado por Sedex®, em envelope do tipo bolha.

O material foi distribuído aos participantes em frascos rotulados com as seguintes informações: nome do programa, item a ser ensaiado, código da amostra e rodada.

4. Análise dos Resultados

4.1. Resultados das Medições dos Laboratórios

Os laboratórios receberam dois itens de ensaio contendo a amostra e foram orientados a proceder como em análise de amostra de rotina. Além dos resultados analíticos, expressos em ng mL^{-1}, os laboratórios participantes informaram também a recuperação (%), o limite de detecção e o limite de quantificação, referentes ao método empregado. As informações foram descritas no Formulário de Registro de Resultados; informações sobre as técnicas e os equipamentos utilizados também foram solicitadas.

4.2. Estabelecimento do Valor Certificado

A caracterização do material de referência foi realizada de acordo com a ABNT ISO GUIA 35, através da utilização de dois métodos distintos feitos por um único laboratório, com a participação de 4 analistas.

Para a caracterização do material foi efetuada a análise de 8 frascos.

4.3. Análise Estatística

Neste tópico estão descritas as análises estatísticas utilizadas para a avaliação da estabilidade do MRC produzido, do desvio padrão utilizado na avaliação dos laboratórios (desvio padrão de *Horwitz*), bem como para a avaliação do desempenho dos laboratórios participantes.

4.3.1. Avaliação da Estabilidade do Material de Referência Certificado

O documento da *European Reference Materials* (**ERM**) descreve uma possibilidade de comparação de um resultado obtido em uma dada medição ao valor de um MRC. Objetivamente, é fornecido um critério matemático para a tomada de decisão da "concordância" entre os valores.

O princípio baseia-se na comparação entre a diferença dos valores obtidos levando em consideração as incertezas associadas à medição e ao MRC. Em outras palavras, considera-se uma boa concordância quando esta diferença de resultados é menor que a soma das incertezas expandidas, a saber (Equação 1):

$$\Delta_m \leq U_\Delta \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

Δ_m= Valor absoluto da diferença entre o valor medido médio e o valor certificado

U_Δ = Incerteza expandida do resultado da medição e do valor certificado

Sendo:

$$\Delta_m |C_m - C_{MRC}| \qquad \text{(Equação 2)}$$

$$U_\Delta = 2 \times u_\Delta = 2 \times \sqrt{u_m^2 + u_{MRC}^2} \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

C_m = Valor medido médio

u_m^2 = incerteza do resultado da medição

C_{MRC} = Valor certificado

u_{MRC}^2 = incerteza do valor certificado

Os itens de ensaio foram armazenados na temperatura de referência desde o fim de sua certificação em 2010.

Três itens de ensaio foram analisados em duplicata após a realização deste EP.

O valor médio da medição (C_m) foi obtido das médias de todos os resultados e a incerteza padrão[1] foi determinada (u_m).

4.3.2. 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 8.4 da norma ISO 13528, isto é, como proposto originalmente por *Horwitz*, onde a precisão interlaboratorial é avaliada em termos de um desvio padrão de reprodutibilidade (Equação 4), onde: σ_H é o desvio padrão de *Horwitz* e *c* é o nível de concentração expresso em fração mássica.

$$\sigma_H = 0{,}02 \times c^{0{,}8495} \qquad \text{(Equação 4)}$$

Adotando-se as modificações propostas por *Thompson* onde são levados em consideração os níveis de concentração do analito expressos em fração mássica, conforme as Equações. 5, 6 e 7, onde σ_H é o desvio padrão de *Horwitz* e *c* é o nível de concentração expresso em fração mássica.

[1] Desvio padrão dividido por raiz de n.

$$\sigma_H = 0{,}02 \times c, \text{ se } c < 1{,}2 \times 10^{-7} \quad \text{(Equação 5)}$$

$$\sigma_H = 0{,}02 \times c^{0{,}8495}, \text{ se } 1{,}2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0{,}138 \quad \text{(Equação 6)}$$

$$\sigma_H = 0{,}02 \times c^{0{,}5}, \text{ se } c > 0{,}138 \quad \text{(Equação 7)}$$

4.3.3. Índices 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 8, onde x_i representa o valor do laboratório participante, x* representa o valor designado (média robusta) e σ_H o desvio padrão de *Horwitz*.

$$z = \frac{x_i - x^*}{\sigma_H} \quad \text{(Equação 8)}$$

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

$\lvert z \rvert \leq 2$	Resultado satisfatório
$2 < \lvert z \rvert < 3$	Resultado questionável
$\lvert z \rvert \geq 3$	Resultado insatisfatório

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

De acordo com Monteiro (2010), o Material de Referência produzido mostrou-se suficientemente homogêneo e equivalente para dois dos três lotes. Em relação à estabilidade, o material mostrou-se estável na temperatura de 40°C por até 7 dias, nas temperaturas de 6 °C e de -20°C por até 7 meses e armazenado na temperatura -70°C durante muito mais tempo, visto que esta é a temperatura de referência.

Como descrito em 4.3.1, foram avaliados 03 (três) MRC após a realização deste EP.

Os resultados destas análises em duplicata estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados gerados na avaliação da estabilidade, em ng.mL^{-1}.

	Replicata A	**Replicata B**
Item 1	195,5	204,5
Item 2	199,5	209,0
Item 3	203,0	193,5
	Média ± u →	200,8 ± 2,4

Da certificação do material (Monteiro, 2010)[2] temos (todos os valores em ng.mL^{-1}):

C_{MRC} = 181,4 U_{MRC} = 47,7 u_{MRC} = 23,9

Assim:

$\Delta_m |C_m - C_{MRC}|$=|200,8-181,4|= 19,4

$U_\Delta = 2 \times u_\Delta = 2 \times \sqrt{u_m^2 + u_{MRC}^2}$ = 2 x $\sqrt{2{,}4^2 + 23{,}9}$ = 24

O critério $\Delta_m \leq U_\Delta$ foi atingido e o MRC foi considerado estável para o propósito deste EP.

[2] Dissertação de mestrado.

6. Atribuição do Valor Designado

Como nesta rodada foi utilizado um MRC e o mesmo demonstrou estabilidade suficiente, o valor designado relativo à concentração de oxitetraciclina deste ensaio de proficiência será o valor certificado por Monteiro (2010). O valor certificado, a incerteza do valor certificado (U_{MRC}) e o desvio padrão alvo para o Ensaio de Proficiência (desvios padrão de *Horwitz*) estão transcritos na Tabela 2

Tabela 2: Valor certificado, incerteza expandida do valor certificado e desvio padrão de *Horwitz*, todos em ng mL^{-1}.

Analito	Valor Certificado	U_{MRC}	DP Horwitz (σ_H)
Oxitetraciclina	**181**	48	**38**

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Nove laboratórios se inscreveram na 6ª Rodada do Programa de Ensaio de Proficiência para a Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos – Tetraciclinas em Leite. Cinco (55,6 %) laboratórios inscritos (participantes) enviaram os resultados no prazo proposto.

Dos laboratórios participantes, três (60,0 %) são acreditados na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 na análise de tetraciclinas em leite e um (20,0%) está em fase de acreditação. Quatro (80,0%) laboratórios tem a metodologia validada.

7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes

Os dados reportados pelos laboratórios participantes do ensaio de proficiência foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na ABNT ISO/IEC 17043. A Tabela 3 apresenta um sumário dos dados reportados pelos laboratórios.

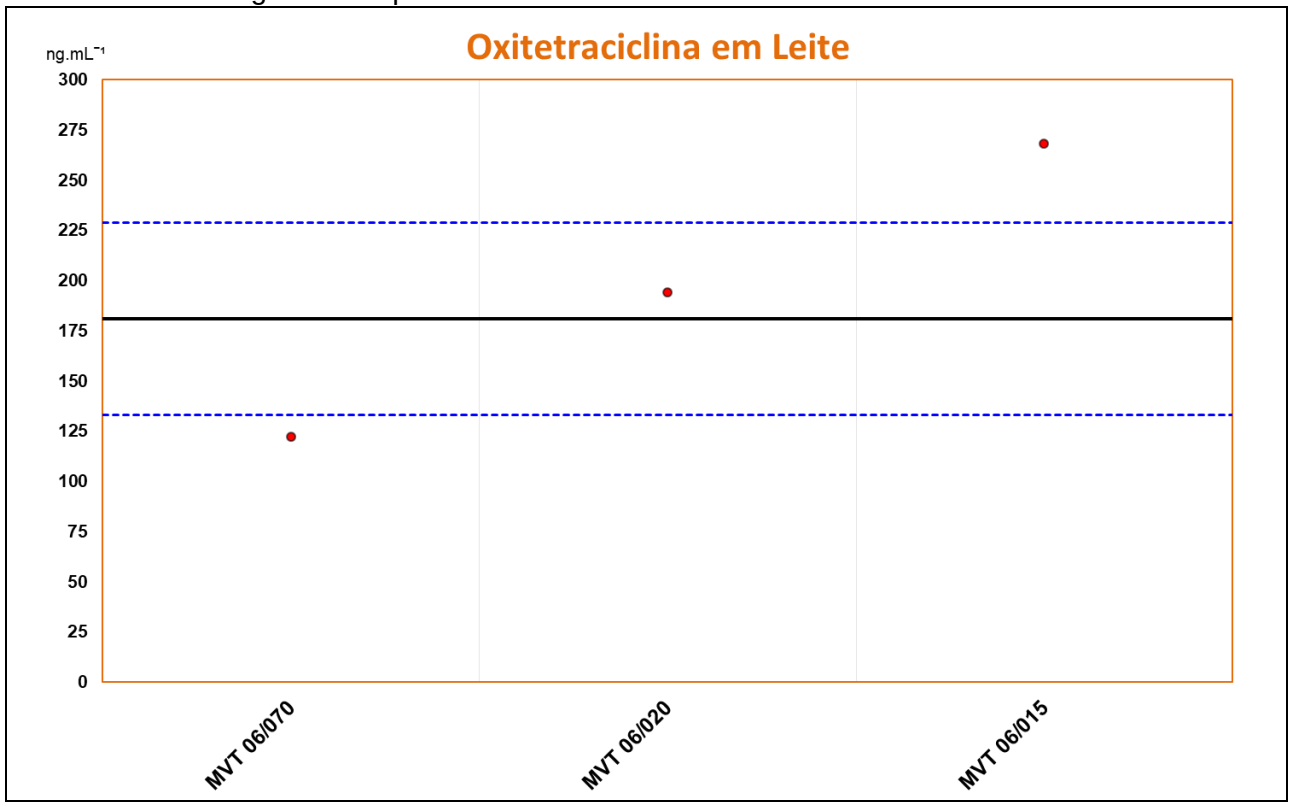
O gráfico da dispersão dos resultados dos laboratórios encontra-se na Figura 1. No gráfico a linha central representa o valor certificado e as linhas pontilhadas em azul a incerteza expandida do valor certificado.

Tabela 3: Método, Técnica de Quantificação, Item de Ensaio e Parâmetros do Método.

Laboratório	Método			Técnica de Quantificação	Item de Ensaio				Parâmetros	
	Acreditado	Validado	Rotina		Código #	Resultado ng mL^{-1}	Código #	Resultado ng mL^{-1}	Limite de Detecção ng mL^{-1}	Limite de Quantificação ng mL^{-1}
MVT 06/015	Sim	Sim	Não	UPLC-MS/MS	**02**	268,14	40	<LOD	19,15	50
MVT 06/020	Sim	Sim	Sim	LC-MS/MS	**11**	193,81	35	NQ	-	25
MVT 06/035	Não	Não	Não	Imunoensaio	10	-	**38**	-	-	-
MVT 06/042	Fase de Acreditação	Sim	Não	UHPLC-MS/MS	**17**	-	27	-	-	-
MVT 06/070	Sim	Sim	Sim	LC-MS/MS	07	< LOQ	**22**	122	-	25

Em **azul** os MRC proveniente do leite pós inoculação.

Figura 1: Dispersão dos resultados – Oxitetraciclina em Leite



7.3. Cálculo do Índice z

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z (Equação 8), está apresentada na Tabela 4.

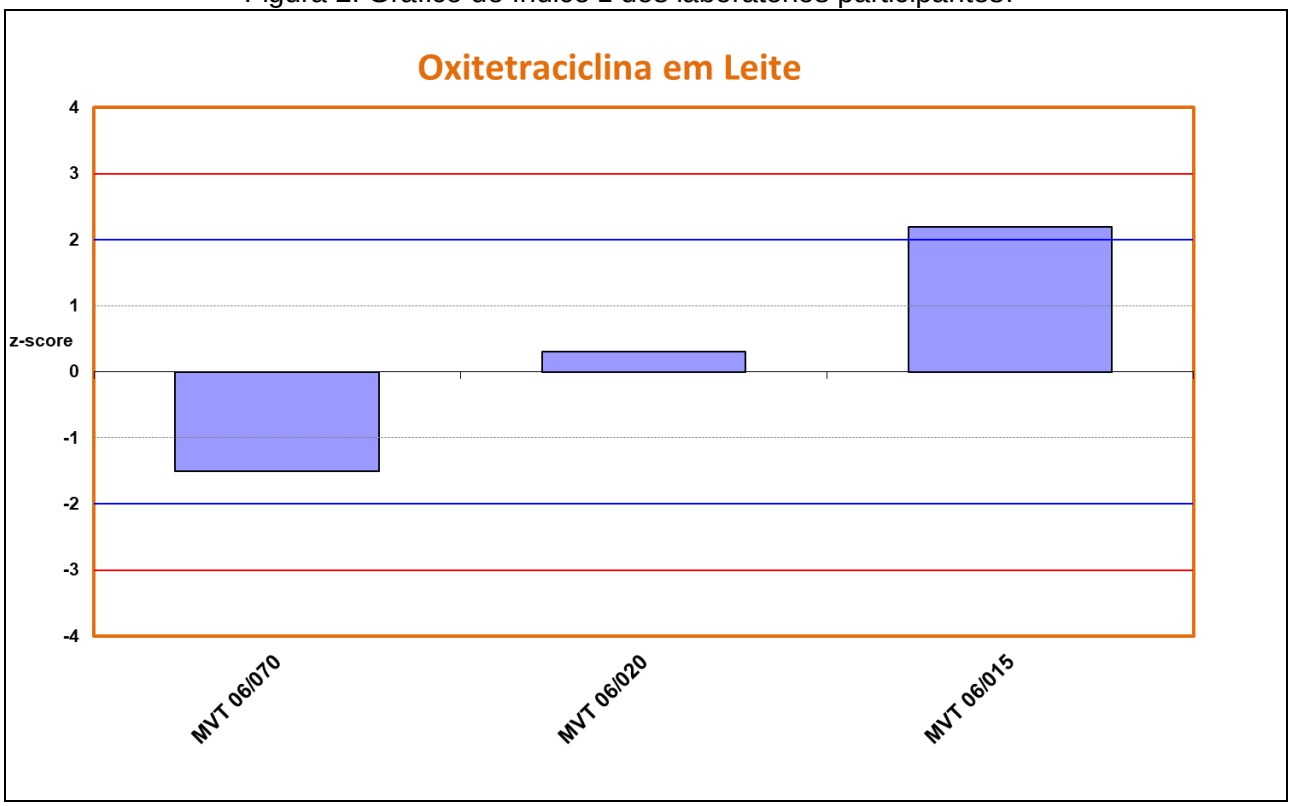
Tabela 4: Valores do índice z obtidos pelos laboratórios participantes.

Código do Laboratório	Resultado (ng mL^{-1})	z-score
MVT 06/015	268,14	2,2
MVT 06/020	193,81	0,3
MVT 06/070	122	-1,5

Azul = resultado questionável; **Vermelho** = resultado insatisfatório.

A Figura 2 apresenta os resultados de índice z' obtidos pelos laboratórios participantes.

Figura 2: Gráfico de índice z dos laboratórios participantes.



8. Conclusões e Comentários

Todos os laboratórios participantes que informaram a capacidade analítica de analisar oxitetraciclina identificaram corretamente o frasco enviado que efetivamente a continha. Os participantes MVT 06/035 e MVT 06/042 utilizaram métodos que não identificavam o analito oxitetraciclina ou não dispunham de capacidade analítica para tal determinação.

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- Dos três laboratórios que identificaram e quantificaram oxitetraciclina, dois (66,7 %) atingiram o valor de índice z' ≤ |2|, um laboratório (33,3 %) reportou resultado questionável;
- Para o laboratório que obtive resultado questionável, ações corretivas podem ser adotadas para o aprimoramento das suas medições. Uma avaliação detalhada, desde o recebimento do material e seu armazenamento, até o preenchimento do Formulário para Registro dos Resultados, e a avaliação de todos os passos da metodologia de análise, será importante para a identificação dos pontos críticos.

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

9. Confidencialidade

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

10. Modificações em Relação à Versão Anterior

Esta é a primeira versão do relatório, não existindo versões anteriores.

11. Referências Bibliográficas

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

ABNT ISO/IEC 17043. Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais Para Ensaios de Proficiência, **2011**.

ABNT ISO GUIA 35 – Materiais de Referência – Princípios Gerais e Estatísticos para Certificação. **2012.**

CODEX ALIMENTARIUS. *Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis*: CAC/GL 40-1993, Rev. 1-2003. Rome: FAO/WHO Joint Publications, **2003.**

Horwitz, W; Albert, R; "The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision"; *J. Assoc. off AOAC International*.; 89(4); 1095-1109; **2006**.

Horwitz, W; Kamps, L.R; Boyer, K.W; "Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents"; *J. Assoc. off Anal. Chem*.; 63(6); 1344-1354; **1980**.

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. **2015**.

MONTEIRO, M. A. **Produção de Material de Referência Certificado de Oxitetraciclina em Leite**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 107. **2010**.

The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem*., Vol. 78, N$^{o.}$ 1, pp. 145–196, **2006**.

Thompson, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. (**DOI: 10.1039/b000282h**) *Analyst*, 125, 385-386, **2000**.

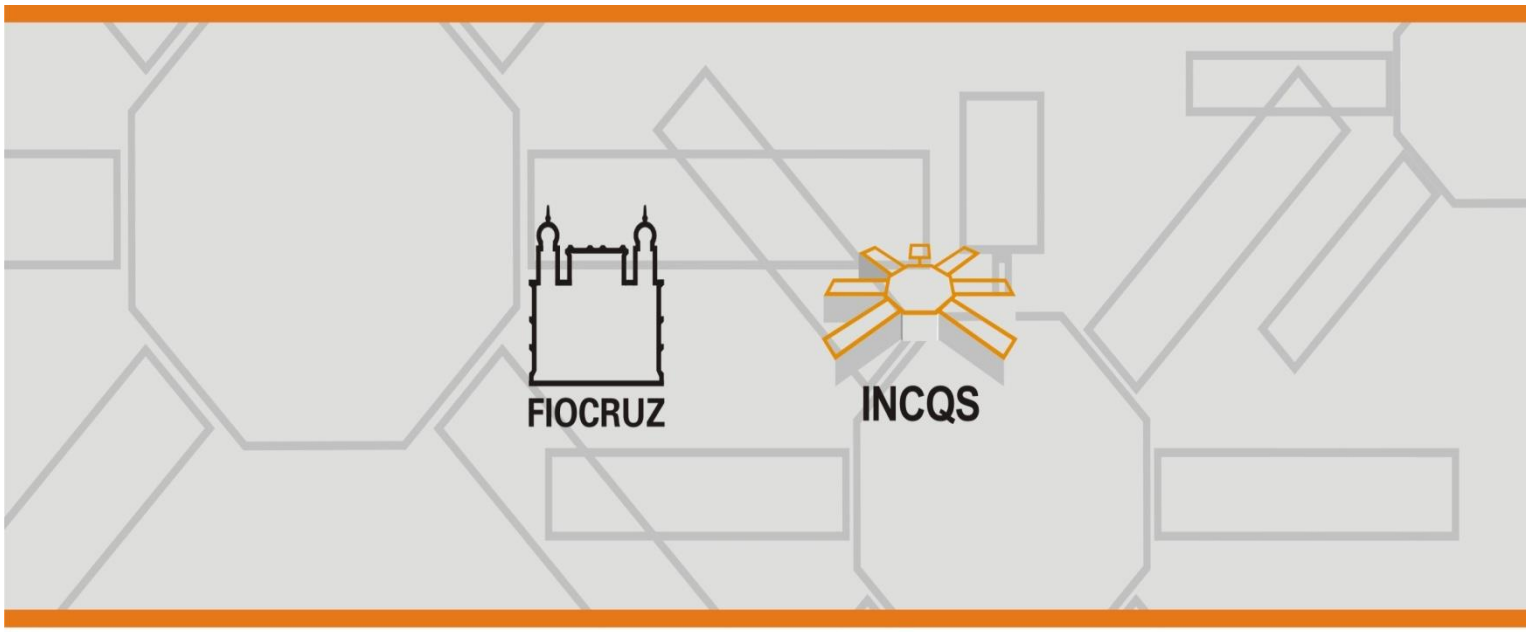
12. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Laboratórios participantes da 6ª Rodada do Ensaio de Proficiência para Determinação de Medicamentos Veterinários em Alimentos – Tetraciclinas em Leite.

Instituição
Belize Agricultural Health Authority Central Investigation Laboratory – BELIZE
Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas-LARP / Universidade Federal de Santa Maria-UFSM – BRASIL
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – LFDA/RS – BRASIL
Nanocore Biotecnologia – BRASIL
NQAC Araras - Nestlé Quality Assurance Center – BRASIL

- Total de participantes: 5 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