

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

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia
de Alimentos 38ª Rodada –
Enumeração de Coliformes
Termotolerantes em Leite**

EP MIB 38/21



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 38ª Rodada –
Enumeração de Coliformes Termotolerantes 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

- COMITÊ TÉCNICO

Jéssica Soldani Couto
Katarine Coutinho Silva
Nathalia Gonçalves Santos Caldeira
Sílvia Maria dos Reis Lopes


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	6
7.1. Laboratórios Participantes.....	6
7.2. Resultados dos Laboratórios Participantes	7
7.3. Cálculo do Índice z	7
7.4. Valores de contagem	7
7.5. Informação importante sobre os Itens de Ensaio	7
8. Conclusões e Comentários	8
9. Confidencialidade	8
10. Referências Bibliográficas.....	9
11. Laboratórios Participantes.....	10

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 38ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes 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 Enumeração de Coliformes Termotolerantes 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 das normas [ABNT ISO/IEC 17043](#) e [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 *Escherichia coli* identificada como P5444 e depositada na “Coleção de Pesquisa de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”.

3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Vinte 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 ISO GUIA 35.

3.4. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio

Os frascos foram armazenados em *ultrafreezer* ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) até o momento em que foram enviados aos laboratórios participantes.

Para cada laboratório inscrito no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 38ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes em Leite - foi enviado 1 (um) frasco 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-la quanto à temperatura de recebimento, bem como a integridade da embalagem e da amostra. 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 a análise para enumeração de Coliformes Termotolerantes segundo a metodologia empregada no laboratório e expressar os resultados em **NMP.g⁻¹** ou **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 (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.

4.2 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 a partir 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.

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

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 *E. coli* apresentou-se homogêneo e estável para a presença deste micro-organismo.

6. Atribuição do Valor Designado

Como não houve o número mínimo de resultados para a determinação do valor designado¹, este não foi calculado e os laboratórios não serão avaliados, tendo seus resultados somente apresentados.

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Dezenove laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 38ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes em Leite e todos enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, nenhum é acreditado na norma [ISO/IEC 17025](#) e dois laboratórios (10,5 %) encontram-se em processo de acreditação na referida norma.

Quanto à natureza do laboratório, 17 (89,5%) são governamentais, sendo 16 (84,2%) Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacens ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. Dois laboratórios privados completam a lista de participantes. A [Tabela 2](#) apresenta a listagem dos laboratórios participantes.

¹ Critério 5 do item 12 do Protocolo do EP em Microbiologia de Alimentos 38ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes em Leite – EP MIB 38/21 rev. 00

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 1 apresenta os resultados e a metodologia empregada.

Tabela 1: Resultados por análise e metodologia empregada.

Código dos laboratórios	<i>Escherichia coli</i>		Metodologias ¹
	Item #	Resultado	
MIB 38/102	117	> 2.400 (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/111	118	> 1,1 x 10 ⁴ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/115	113	1,1 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2001
MIB 38/124	107	9,3 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/125	101	1,1 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/131	104	> 1,1 x 10 ³ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2001
MIB 38/132	119	1.100 (NMP.g ⁻¹)	Outros
MIB 38/134	103	1,1 x 10 ⁴ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/143	110	163 x10 ⁻⁴ (UFC.g ⁻¹)	Não Informada
MIB 38/157	114	> 1,1 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/158	102	> 1,6 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA
MIB 38/161	112	> 11.000 (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/167	109	>1.100 (NMP.g ⁻¹)	Outros
MIB 38/172	108	≥ 1,1 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/175	116	> 1,1 x 10 ⁵ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/178	106	2,4 x 10 ⁴ (UFC.g ⁻¹)	Outros
MIB 38/180	115	>1.100 (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/184	111	> 1,1 x 10 ⁴ (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015
MIB 38/185	120	<3 (NMP.g ⁻¹)	APHA 2015

(1) APHA® → Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods: Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. 5^{ed.} Washington, D.C: APHA, 2015; 4th edition, 2001; APHA (Davidson *et al.*, 2004) para produtos lácteos.

Outros:

FENG P, WEAGANT SD, GRANT MA, BURKHARDT W, Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria Bacteriological Analytical Manual. Cap. 4. Atualizado em Jul. 2014;

Manual de Microbiologia de Alimentos de Regina Silva Siqueira - EMBRAPA - 1995; Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água de Neusely da Silva e outros - 4ª edição – 2010; e

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água - Ital

7.3. Cálculo do Índice z

O índice z não foi calculado, pois não há valor designado para a rodada.

7.4. Valores de contagem

Somente dois laboratórios, MIB 38/143 e MIB 38/178 informaram os resultados em UFC.g⁻¹ não sendo possível o cálculo de um valor designado utilizando está técnica.

7.5. Informação importante sobre os Itens de Ensaio

Infelizmente, pelas regras estabelecidas no protocolo da rodada, não foi possível a obtenção de valores designados tanto para a técnica de Número Mais Provável (NMP) quanto para a técnica de contagem. Contudo serão informadas aqui as características deste material para que os laboratórios possam fazer uma auto avaliação de sua participação.

Este material foi certificado como valor indicativo em 2016 (Rosas, 2018) para a técnica de contagem e desde então vem sendo monitorada a sua estabilidade. O valor estabelecido para a concentração de *E. coli* foi de $(6,31 \pm 0,34) \text{ Log}_{10} (\text{UFC.mL}^{-1})$, o que corresponde à: $\sim 2,0 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ com a incerteza abrangendo o seguinte intervalo: $(9,3 \times 10^5 - 4,5 \times 10^6) \text{ UFC.mL}^{-1}$.

O valor obtido pelo Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS/Fiocruz após o dia 09/04/2021, para a análise em duplicata de dois itens de ensaio (n=4) foi $1,5 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ com intervalos de $(1,4 \times 10^6 - 1,7 \times 10^6) \text{ UFC.mL}^{-1}$.

A ISO 22117 estabelece como valor adequado para o desvio padrão alvo para EP microbiológicos o valor de $0,25 \text{ Log}_{10} (\text{UFC.mL}^{-1})$ para a técnica de contagem e $0,32 \text{ Log}_{10} (\text{NMP.mL}^{-1})$ para a técnica de NMP.

8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O número de laboratórios inscritos neste ensaio de proficiência totalizou dezenove e todos encaminharam resultados até a data prevista no protocolo;
- Dos 19 laboratórios, somente dois apresentaram resultados utilizando a técnica de contagem;
- Dos dezessete laboratórios que utilizaram a técnica de NMP, doze (70,6%) informaram resultados não numéricos, isto é, maior que ou menor que não permitindo a determinação do valor designado;
- A técnica do NMP recomenda que sejam feitas várias diluições quando não se conhece a concentração do produto, para não obter um resultado 3:3:3 ou seja, um valor “maior que”;
- O Laboratório **MIB 38/143** expressou o resultado com potência negativa (10^{-4});
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Quinze (78,9%) 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;

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, **2017**.

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 — Guia para Caracterização e Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2020**.

BRASIL. Instrução Normativa N.º 60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológico para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, n.249, p.133, 26 dez. **2019**. Seção1.

BRASIL. Resolução RDC n.º 331 de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, n.249, p.96, 26 dez. **2019**. Seção1.

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”, Geneve, **2015**.

International Organization for Standardization – ISO 22117. “Microbiology of the Food Chain – Specific Requirements and Guidance for Proficiency Testing by Interlaboratory Comparison.” Geneve, **2019**.

ROSAS, C. O. Desenvolvimento de Materiais de Referência Microbiológicos Certificados por Métodos Fenotípicos e Moleculares. [Tese](#) (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 186. 2018.

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

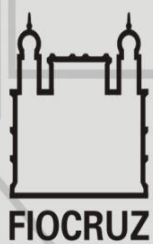
11. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa é apresentada na [Tabela 2](#).

Tabela 2: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 38ª Rodada – Enumeração de Coliformes Termotolerantes em Leite.

Laboratórios Participantes
ADM do Brasil – Nutrition Uberlândia
BioQuality
Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Bauru – Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Instituto Adolfo Lutz – CLR de São José do Rio Preto
Instituto Adolfo Lutz – CLR IAL Sorocaba XI
Laboratório Central do Estado do Paraná – Unidade Alto da XV – Curitiba
Laboratório Central Dr. Almino Fernandes – LACEN RN
Laboratório de Bromatologia – Secretaria Municipal de Belo Horizonte
Laboratório de Microbiologia Alimentar – Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos
Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos – Lacen RS
Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Lacen BA
Laboratório Municipal de Saúde Pública Dr. Jeferson Ignacio de Araújo
Lacen – DF
Lacen – RJ
LMA – Fortaleza
Núcleo de Ciências Químicas Bromatológicas – CLR – IAL – Araçatuba I
Seção de Análises Microbiológicas – Laboratório Central do Estado do Pará
Seção de Microbiologia de Alimentos – Lacen GO

- Total de participantes: 19 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