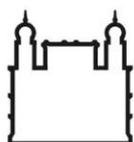


Ensaio de Proficiência em Produtos  
Sujeitos ao Regime de Vigilância Sanitária  
(EP/INCQS)

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia  
de Alimentos 40ª Rodada –  
Contagem de *Bacillus cereus* em Leite**

**EP MIB 40/21**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 40ª Rodada –  
Contagem de Bacillus cereus 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

Silvia 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 ( $u_{x^*}$ ).....	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 .....	11
9. Confidencialidade .....	11
10. Referências Bibliográficas.....	12
11. 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 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 40ª 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 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 *Bacillus cereus* identificada como P6879 e depositada na “Coleção de Pesquisa 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 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 40ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* 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 contagem de *Bacillus cereus* segundo a metodologia empregada no laboratório e expressar os resultados em **UFC.g<sup>-1</sup>**. 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 **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 líofilo, sendo os resultados expressos em UFC.g<sup>-1</sup>.

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 Valore 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 ( $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>).

	$x^*$	$s^*$	$u_c$	$k$	$U$	$S'_{(EP)}$
<i>Bacillus cereus</i>	5,422	0,156	0,056	2,25	0,13	0,17

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

Treze laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 40ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite. Doze (92,3%) enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, dois (16,7%) são acreditados na norma ISO/IEC 17025 e um laboratório (8,3 %) encontra-se em processo de acreditação na norma citada.

Quanto à natureza dos laboratórios, todos são Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacens ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. 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 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 <sup>1</sup>
	Item #	Resultado (UFC.g <sup>-1</sup> )	
MIB 40/304	320	2,5 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/307	316	3,5 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/308	309	3,0 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/312	305	1,7 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/314	318	3,5 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/327	303	3,3 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/334	306	2,1 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/340	307	2,3 x 10 <sup>5</sup>	APHA
MIB 40/348	313	2,3 x 10 <sup>5</sup>	Outras
MIB 40/364	304	4,1 x 10 <sup>4</sup>	Outras
MIB 40/380	301	1,0 x 10 <sup>6</sup>	APHA
MIB 40/389	302	290000	Outras

(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, APHA. 2001;

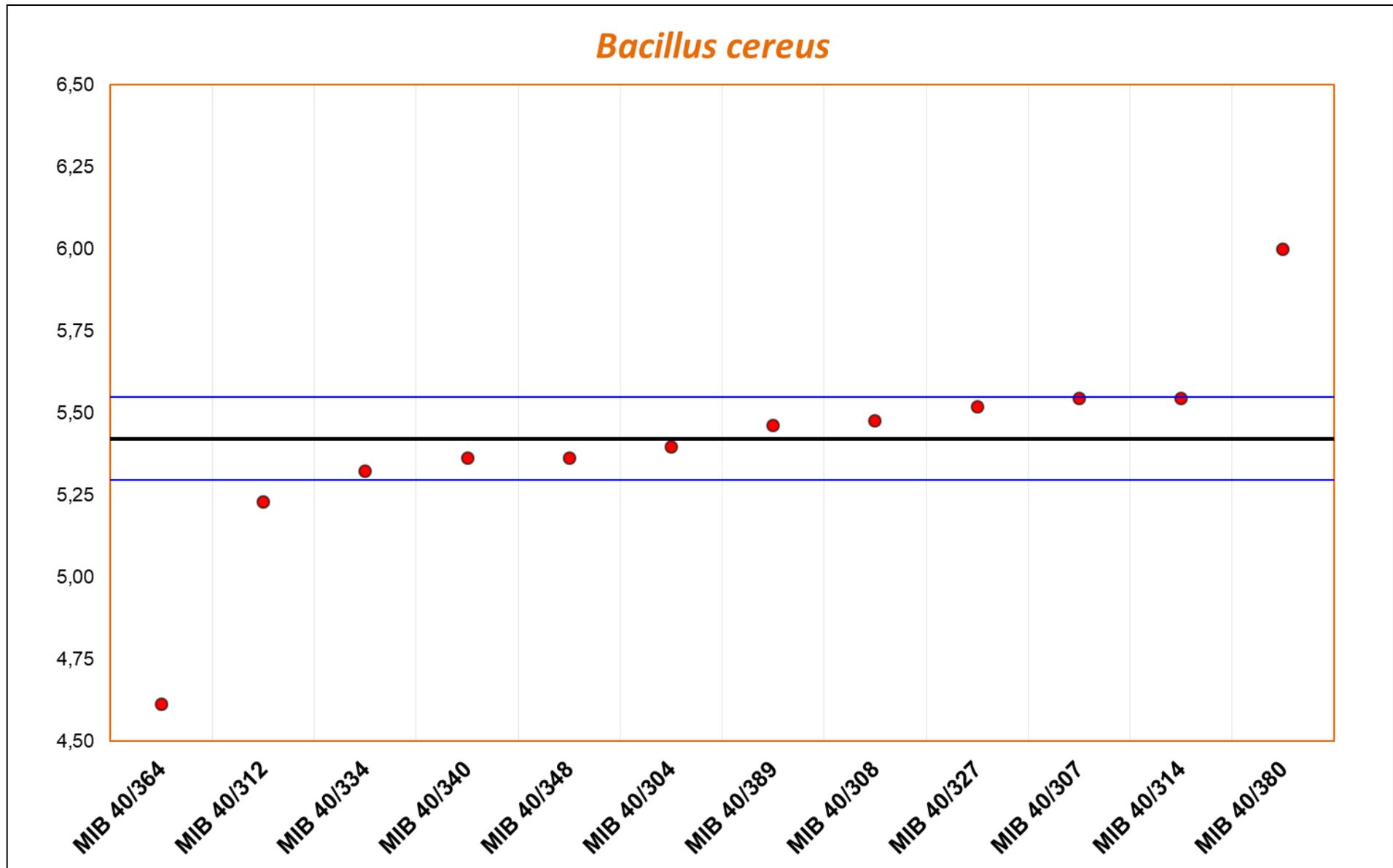
(2) Outras:

ISO 7932:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 degrees C / ISO 7932:2004/AMD 1:2020. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 degrees C. Amendment 1: Inclusion of optional tests;

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;

ABNT NBR ISO 7932:2016 - Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal — Método horizontal para a enumeração presuntiva de *Bacillus cereus* — Técnica de contagem de colônias a 30 °C, 2016.

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.

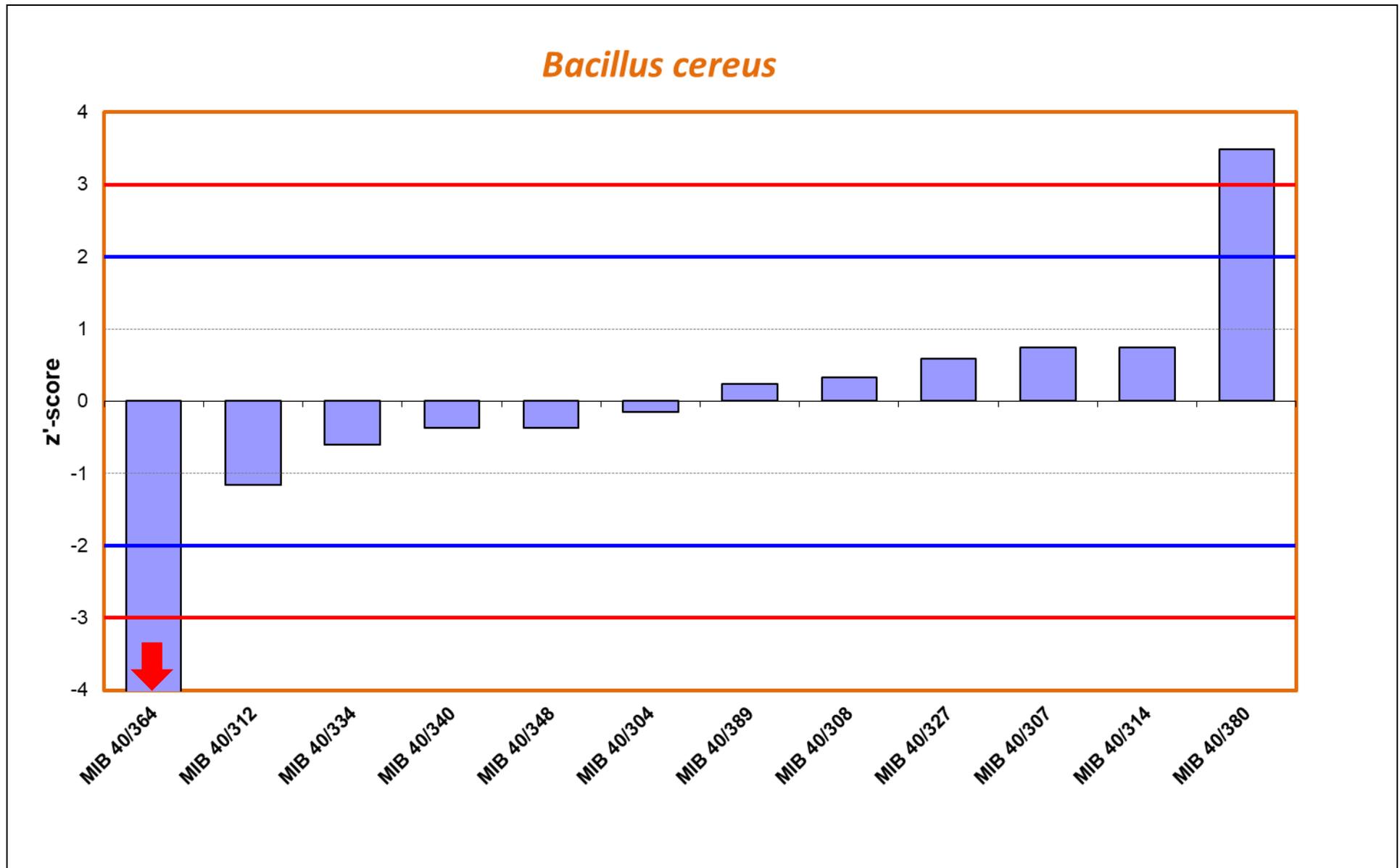
Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (UFC.g <sup>-1</sup> )	Índice z'
MIB 40/304	320	2,5 x 10 <sup>5</sup>	-0,1
MIB 40/307	316	3,5 x 10 <sup>5</sup>	0,7
MIB 40/308	309	3,0 x 10 <sup>5</sup>	0,3
MIB 40/312	305	1,7 x 10 <sup>5</sup>	-1,1
MIB 40/314	318	3,5 x 10 <sup>5</sup>	0,7
MIB 40/327	303	3,3 x 10 <sup>5</sup>	0,5
MIB 40/334	306	2,1 x 10 <sup>5</sup>	-0,6
MIB 40/340	307	2,3 x 10 <sup>5</sup>	-0,3
MIB 40/348	313	2,3 x 10 <sup>5</sup>	-0,3
MIB 40/364	304	4,1 x 10 <sup>4</sup>	-4,8
MIB 40/380	301	1,0 x 10 <sup>6</sup>	3,4
MIB 40/389	302	290000	0,2

Em **vermelho**, resultados insatisfatórios.

A [Figura 2](#) apresenta o resultado de índice z' obtido pelos laboratórios participantes para o item de ensaio.

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*



## 8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O número de laboratórios inscritos neste ensaio de proficiência totalizou treze. Doze (92,3 %) encaminharam os resultados até a data prevista no protocolo;
- Dos doze laboratórios que enviaram o resultado, dez (88,3 %) atingiram o valor de índice  $z' \leq |2|$ , considerado **satisfatórios**, dois laboratórios foram considerados **insatisfatórios**;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Nove (75,0 %) 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, 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, **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 — 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, 2005.

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

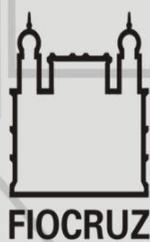
## 11. Laboratórios Participantes

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

Tabela 4: Laboratórios participantes do EP em Microbiologia de Alimentos 40ª Rodada – Contagem de *Bacillus cereus* em Leite.

Laboratórios Participantes
Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Bauru – Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Instituto Adolfo Lutz – CLR IAL Sorocaba XI
Laboratório Central do Estado do Paraná – Unidade Alto da XV – Curitiba
Laboratório de Bromatologia – Secretaria Municipal de Belo Horizonte
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
Núcleo de Ciências Químicas Bromatológicas – CLR – IAL – Araçatuba I
Seção de Microbiologia de Alimentos – Lacen GO
Serviço de Microbiologia de Produtos do Lacen MG

- Total de participantes: 12 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](http://www.incqs.fiocruz.br)