

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

**Ensaio de Proficiência em Microbiologia
de Alimentos 43ª Rodada –
Enumeração de *Escherichia Coli*
em Ovos**

EP MIB 43/22



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



INCQS



**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 43ª Rodada –
Enumeração de Escherichia coli em Ovo**

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

Jessica Soldani Couto
Katarine Coutinho Silva
Marcielli Silva Almeida
Nathalia Gonçalves Santos Caldeira
Rodrigo Domingos Overa Tavares
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 (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 Valor 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'	8
7.4. Valores de contagem	9
7.5. Homogeneidade, Estabilidade e Avaliação Controle Realizada pelo INCQS	9
8. Conclusões e Comentários.....	9
9. Confidencialidade	9
10. Referências Bibliográficas	10
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 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo – 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 *Escherichia coli* em Ovo, 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 ovo foi selecionada para este EP por ser um alimento de elevado consumo pela população brasileira, e por ser responsável por 213 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) entre 2007 e 2019.

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 P4328 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 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo - 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 *Escherichia coli* 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, em NMP, emitidos por todos os laboratórios participantes mais o resultado do laboratório do INCQS.

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.

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

Nesta rodada, para que fosse atingido o número mínimo de resultados para a determinação do valor designado¹, o resultado da avaliação controle do INCQS foi computada junto aos resultados dos participantes.

Assim, o valor designado, o seu respectivo desvio padrão e incertezas, estão apresentados na [Tabela 1](#).

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

	x^*	s^*	u_c	k	U	$s^*_{(EP)}$	$s'_{(EP)}$
<i>Escherichia coli</i>	2,44	0,62	0,24	2,28	0,54	0,32	0,40

* Como s^* foi maior que 0,32, será utilizado este último valor como desvio padrão para o EP, $s^*_{(EP)}$.²

A incerteza do valor designado não pode ser negligenciada visto que não atende ao critério de ser menor que $0,3.s^*_{(EP)}$, 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.

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

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

¹ Critério 5 do item 12 do Protocolo do EP em Microbiologia de Alimentos 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo – EP MIB 43/22 rev. 00

² Critério 6 do item 12 do Protocolo do EP em Microbiologia de Alimentos 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo – EP MIB 43/22 rev. 00

$|z'| \leq 2$ - Resultado satisfatório

$2 < |z'| < 3$ - Resultado questionável

$|z'| \geq 3$ - Resultado insatisfatório

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Quatorze laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo e treze enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, três (23,1 %) encontram-se em processo de acreditação na norma [ISO/IEC 17025](#).

Quanto à natureza do laboratório, todos são governamentais, sendo 12 (92,3 %) Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacen ou laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias municipais. Um outro laboratório governamental completa 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 [ISO/IEC 17043](#). A [Tabela 2](#) apresenta os resultados e a metodologia empregada.

Tabela 2: Resultados por análise (NMP.g⁻¹) e metodologia empregada.

Código dos laboratórios	<i>Escherichia coli</i>		Metodologias ^{1, 2 e 3}
	Item #	Resultado	
MIB 43/104*	#106	240	Outros
MIB 43/108	#109	43	APHA
MIB 43/121	#108	2400	APHA
MIB 43/130	#116	290	Outros
MIB 43/140*	#118	180	BAM
MIB 43/143	#119	230	BAM
MIB 43/150	#112	1100	APHA
MIB 43/151*	#103	270	Outros
MIB 43/154	#111	1100	Outros
MIB 43/155	#107	240	APHA
MIB 43/168	#110	160	Outros
MIB 43/182	#102	150	APHA
MIB 43/195	#104	43	APHA

* Resultados enviados como UFC.g⁻¹;

- (1) APHA® → APHA - American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 9: Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. 4th and 5th. Washington, D.C., 2001, 2015.
- (2) Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria In: Bacteriological Analytical Manual. Cap. 4. Atualizado em Out. 2020.
- (3) Outros:
AOAC 2016 (PETRIFILM); EN ISO 16649-2; APHA, Compendium of methods for the microbiological examination of foods e BIOMÉRIEUX, TEMPO®: Estação de preparação e Estação de Leitura - Manual do utilizador; AOAC Official methods 998.08; AOAC 2005.03.

7.3. Cálculo do Índice z'

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z' (Equação 2), está apresentada na [Tabela 3](#).

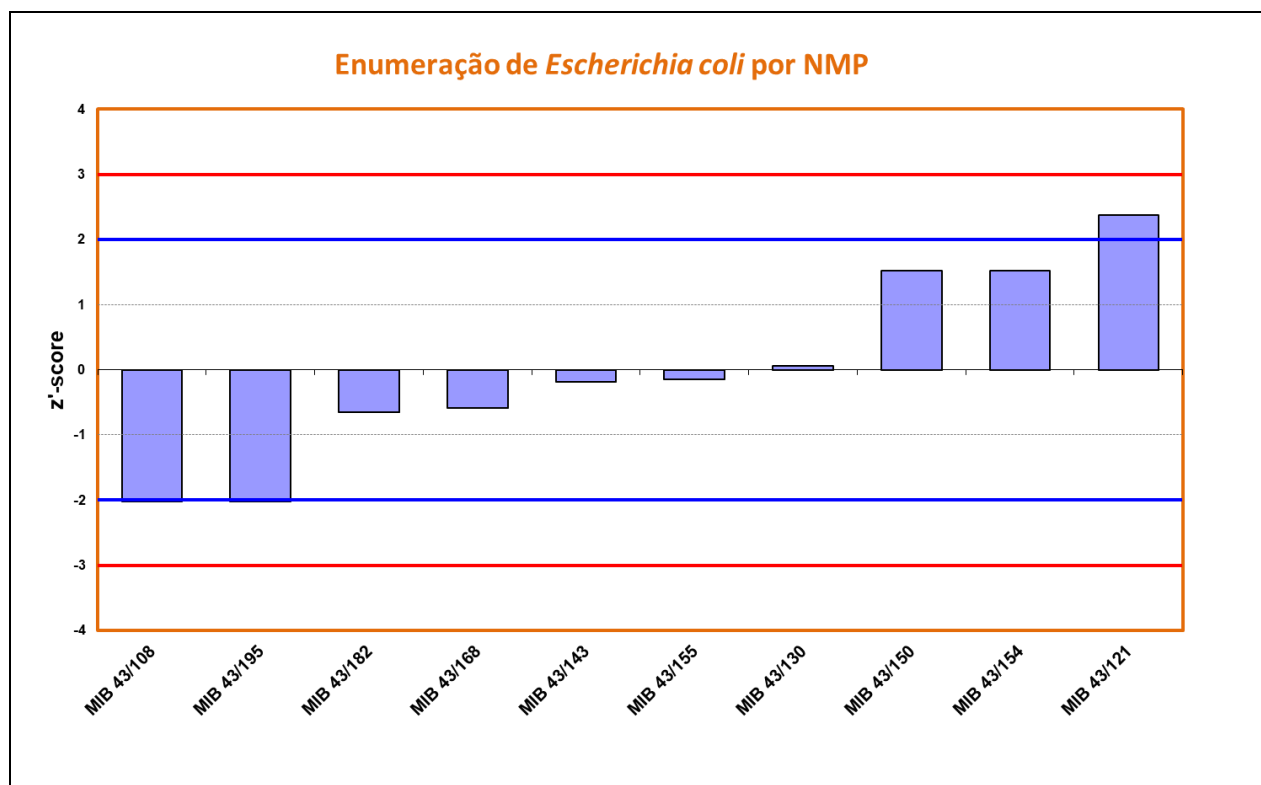
Tabela 3: Valores do índice z' obtidos pelos laboratórios participantes.

Código dos Laboratórios	Número do Item	Resultados (NMP.g ⁻¹)	Índice z'
MIB 43/108	#109	43	-2,0
MIB 43/121	#108	2400	2,3
MIB 43/130	#116	290	0,0
MIB 43/143	#119	230	-0,1
MIB 43/150	#112	1100	1,5
MIB 43/154	#111	1100	1,5
MIB 43/155	#107	240	-0,1
MIB 43/168	#110	160	-0,5
MIB 43/182	#102	150	-0,6
MIB 43/195	#104	43	-2,0

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

A Figura 1 apresenta o resultado de índice z' obtido pelos laboratórios participantes para o item de ensaio.

Figura 1: Gráfico de z'-score: Enumeração de *E. coli* em ovos



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.

7.4. Valores de contagem

Três laboratórios, MIB 43/104, MIB 43/140 e MIB 43/151 informaram os resultados em UFC.g⁻¹ não sendo possível o cálculo de um valor designado utilizando esta técnica, por parte do provedor, visto que não atendeu o número mínimo de resultados requeridos para a determinação estatística.

7.5. Homogeneidade, Estabilidade e Avaliação Controle Realizada pelo INCQS

Para os estudos de homogeneidade e de estabilidade dos itens de ensaio, o Laboratório de Alimentos do Departamento de Microbiologia (DM) do INCQS/Fiocruz utilizou a técnica de contagem. Foi obtido um valor médio para a homogeneidade de 684 UFC.g⁻¹, sendo que a ISO 22117 estabelece como valor adequado para o desvio padrão alvo para EP microbiológicos o valor de 0,25 Log₁₀ (UFC.mL⁻¹) para a técnica de contagem.

O INCQS avaliou, pela técnica do NMP, 5 itens de ensaio para quantificar os resultados esperados por utilização desta técnica pelos laboratórios participantes. Esta avaliação controle obteve os seguintes valores que foram utilizados (média) na determinação do valor designado: 230; 430; 430; 230 e 230 NMP.g⁻¹.

8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- Dos 13 laboratórios participantes, somente três apresentaram resultados utilizando a técnica de contagem;
- Dos dez laboratórios que utilizaram a técnica de NMP, nove (90,0 %) obtiveram resultados considerados satisfatórios;
- O *Formulário de Registro de Resultados* foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- Seis (46,2 %) 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 EP são confidenciais, isto é, cada laboratório é identificado por código individual conhecido apenas pelo participante da rodada e pela Coordenação. Os resultados obtidos poderão ser utilizados em trabalhos e publicações do provedor mantendo a confidencialidade dos 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 — Princípios Gerais e Estatísticos para Certificação, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **2020**.

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, **2022**.

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

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

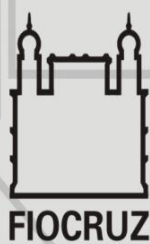
11. Laboratórios Participantes

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 43ª Rodada – Enumeração de *Escherichia coli* em Ovo.

Laboratórios Participantes
Instituto Adolfo Lutz
Instituto Adolfo Lutz – CLR Araçatuba I
Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels
Laboratório de Bromatologia de Belo Horizonte
Laboratório de Microbiologia de Alimentos – LASP/IVISA-Rio
Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos – IMA
Lacen – DF
Lacen – GO Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros
Lacen – MS
Lacen – PR Laboratório Central do Estado do Paraná
Lacen – RN Laboratório Central Dr. Almino Fernandes
Lacen – RS
Lacen – SC Laboratório Central de Saúde Pública

- Total de participantes: 13 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