

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

Microbiologia de Alimentos 48^a Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate

Rodada EP MIB 48/23



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde





**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 48ª Rodada
– Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate**

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 (COR)

COMISSÃO DO PROGRAMA DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA (CPEP)

Armi Wanderley da Nóbrega – Coordenador Geral

Marcus Henrique Campino de la Cruz – Coordenador Técnico

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso – Coordenadora da Qualidade

COMITÊ TÉCNICO (CT)

Larissa Adão Rodrigues

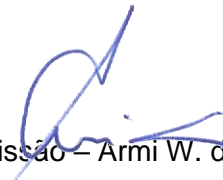
Marcielli Silva Almeida

Mariana Camille de Melo Moura

Nathalia Gonçalves Santos Caldeira

Rodrigo Domingos Overa Tavares

Silvia Maria dos Reis Lopes


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

11/novembro/2023

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Objetivos.....	3
3. Produção dos Itens de Ensaio	4
3.1. Escolha da Matriz.....	4
3.2. Preparo dos Itens 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 dos Itens 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	6
4.3 Índice z.....	6
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. Avaliação dos Laboratórios Participantes.....	9
7.4. Comentários da CPEP em Relação a Alguns Resultados Enviados.....	11
8. Conclusões e Comentários.....	11
9. Confidencialidade.....	11
10. Modificação em Relação a Versão Anterior.....	11
11. Referências Bibliográficas	12
12. Laboratórios Participantes.....	123

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.

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 doenças de origem alimentar 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 de 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 EP no Brasil, na área de microbiologia de alimentos é fundamental para o aumento da confiabilidade dos resultados das medições realizadas, trazendo maior credibilidade aos resultados emitidos.

Visando a promoção da saúde e em apoio a maior competitividade da indústria nacional, o INCQS promoveu o Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 48ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate, 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 quantificação de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate. 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 foram realizados no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/FIOCRUZ, segundo os requisitos da norma [ABNT NBR ISO/IEC 17025](#) para a análise de microrganismos em alimentos.

3.1. Escolha da Matriz

O chocolate possui grande valor nutritivo e energético; de forma que a associação entre cacau, leite e açúcar faz com que 100 g de chocolate ao leite tenha carboidratos (56 g), lipídios (34 g), proteínas (6 g), sais minerais (como potássio, cálcio, magnésio e ferro) e vitaminas (B1, B2 e PP) e 550 Kcal ([TBCA](#)).

O setor de Chocolates fechou 2021 com um volume de produção de 693 mil toneladas, crescimento de 35,9% em relação ao mesmo período de 2020. Seu faturamento no Brasil, em 2021, foi de R\$ 13 bilhões ([ABICAB](#)).

Ainda de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), o Brasil tem um dos maiores mercados do mundo em volume de vendas de chocolate, com uma média de consumo de 2,6 quilos por pessoa/ano.

3.2. Preparo dos Itens de Ensaio

Para este EP foi utilizado um lote, preparado exclusivamente com uma cepa de *Staphylococcus aureus* depositada na “Coleção de Pesquisa de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P6881.

3.3. Homogeneidade e Estabilidade dos Itens de Ensaio

Vinte itens de ensaio do lote preparado foram separados, aleatoriamente, para o teste de homogeneidade. Após a reconstituição e homogeneização do líófilo, foram preparadas diluições decimais e analisadas sob condições de repetitividade.

Foi realizado o estudo de estabilidade de longa duração nas temperaturas de referência e de armazenamento.

A avaliação da homogeneidade foi realizada utilizando o procedimento descrito no [Protocolo Harmonizado](#) e a avaliação da estabilidade o procedimento descrito na [ABNT ISO GUIA 35](#).

3.4. Armazenamento e Envio dos Itens de Ensaio

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

Para cada [laboratório inscrito](#) na 48ª Rodada do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos foi enviado um item de ensaio contendo *Staphylococcus aureus*. Os itens de ensaio foram distribuídos aos participantes em frascos rotulados com as seguintes informações: nome do programa, item a ser ensaiado, código da amostra e rodada.

Os frascos foram enviados aos laboratórios por via aérea, acondicionados 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.

3.5. Recebimento dos Itens de Ensaio

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”, enviada por e-mail aos participantes, e foram instruídos a inspecioná-las quanto à temperatura de recebimento, bem como a integridade da embalagem. Estas 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 estafilococos coagulase positiva 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 (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 UFC, emitidos por todos os laboratórios participantes que enviaram resultados comparáveis.

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 7.7 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 líofilo, **sendo o resultado médio de 4,45 log₁₀ UFC.g⁻¹**.

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

6. Atribuição do Valor Designado

Nesta rodada, nem todos os laboratórios enviaram resultados numéricos ou adequados ao cálculo do valor designado. Contudo, 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 UFC.g⁻¹).

	x^*	s^*	u_c	k	U	$S^*_{(EP)}$	$S^1_{(EP)}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,25	0,30	0,10	2,23	0,23	0,25	0,27

* Como s^* foi maior que 0,25, será utilizado este último valor como desvio padrão para o EP, $s^*_{(EP)}$.¹

¹ Critério 6 do item 12 do Protocolo do EP em Microbiologia de Alimentos 48ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate – EP MIB 48/23 rev. 00

A incerteza do valor designado não pode ser negligenciada visto que não atende ao critério de ser menor que $0,3 \cdot s'_{(EP)}$, assim, esta incerteza será somada ao desvio padrão alvo e os laboratórios serão avaliados em função do índice 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 faixa de valor para a interpretação do índice z' é a mesma do índice z e está descrita no [item 4.3](#).

7. Avaliação do Desempenho dos Laboratórios Participantes

7.1. Laboratórios Participantes

Dezenove laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 48ª Rodada – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate - e todos enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, dois (10,5 %) são acreditados na norma [ABNT NBR ISO/IEC 17025](#).

Quanto à natureza dos laboratórios, dezessete (89,5 %) são laboratórios vinculados às Vigilâncias Sanitárias estaduais ou 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 NBR ISO/IEC 17043](#). A [Tabela 2](#) apresenta os resultados, informações sobre o ensaio e as metodologias empregadas pelos laboratórios participantes.

Tabela 2: Meios de cultura, resultados por análise e metodologia empregada.

Código dos Laboratórios	Diluyente ⁽¹⁾	Meios Utilizados ⁽²⁾	Dificuldade de dissolução do líofilo?	Resultados		Referência Metodológica (ano)
				#	Resultado	
MIB 48/201	SSP	BP	Não	207	3400	APHA (2015)
MIB 48/205	SSP	BP, BHI e PC	Sim	211	16000	ISO 6888-1 (2019)
MIB 48/213	SSP	BP e BHI	Não	216	22400	APHA (2015)
MIB 48/219	SSP	BP, BHI e PC	Não	206	25000	APHA (2015)
MIB 48/229	SSP	Petrifilm [®]	Não	220	Incontável	AOAC 2003.07
MIB 48/231	SSP	BP, BHI e PC	Não	209	40000	APHA (2015)
MIB 48/239	SSP	BP, BHI e PCE	Sim	205	21000	APHA (2015)
MIB 48/246	SSP	BP e BHI	Não	200	17050	APHA (2015)
MIB 48/251	SSP	Meio de cultura TEMPO [®] STA	Não	214	9200	ISO 6888-2
MIB 48/256	SSP	SSP, BP e GS	Não	218	11000	APHA (2015)
MIB 48/258	SSP	Meio de cultura TEMPO [®] STA	Não	212	29000	-
MIB 48/261	APA	Meio de cultura TEMPO [®] STA	Não	203	2720	AOAC 975.55
MIB 48/269	SSP	BP, BHI e PC	Não	208	21000	APHA
MIB 48/276	SSP	BP	Sim	201	38000	APHA (2015)
MIB 48/284	SSP	BP e BHI	Sim	217	19000	ISO 6888-1 (2019)
MIB 48/287	SSP	BP, BHI e TSA	Não	204	22000	APHA (2015)
MIB 48/288	TFB	BP	Não	213	28000	BAM/FDA
MIB 48/294	SSP	BP, BHI, CVF, AMS e PC	Sim	215	46000	APHA (2001)
MIB 48/298	SSP	BP, CM e PC	Não	202	30000	APHA

Em azul, os resultados utilizados na determinação do valor designado.

(1) SSP = Água Peptonada Tamponada 0,1%; APA = Água Peptonada Alcalina 0,1%; e TFB = Tampão Fosfato de *Butterfield*.

(2) AMS = Ágar Manitol Salgado; BHI = *Brain Heart Infusion*; BP = Ágar *Baird-Parker*; CM = Caldo Manita; CVF = Caldo Vermelho de Fenol/Manitol; GS = Gelose Simples PC = Plasma de Coelho; PCE = Plasma de Coelho com EDTA; e TSA = Ágar *Tripticaseína* de Soja.

7.3. Avaliação dos Laboratórios Participantes

A avaliação de desempenho dos laboratórios participantes, expressa através do índice z' , está apresentada na Tabela 3.

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

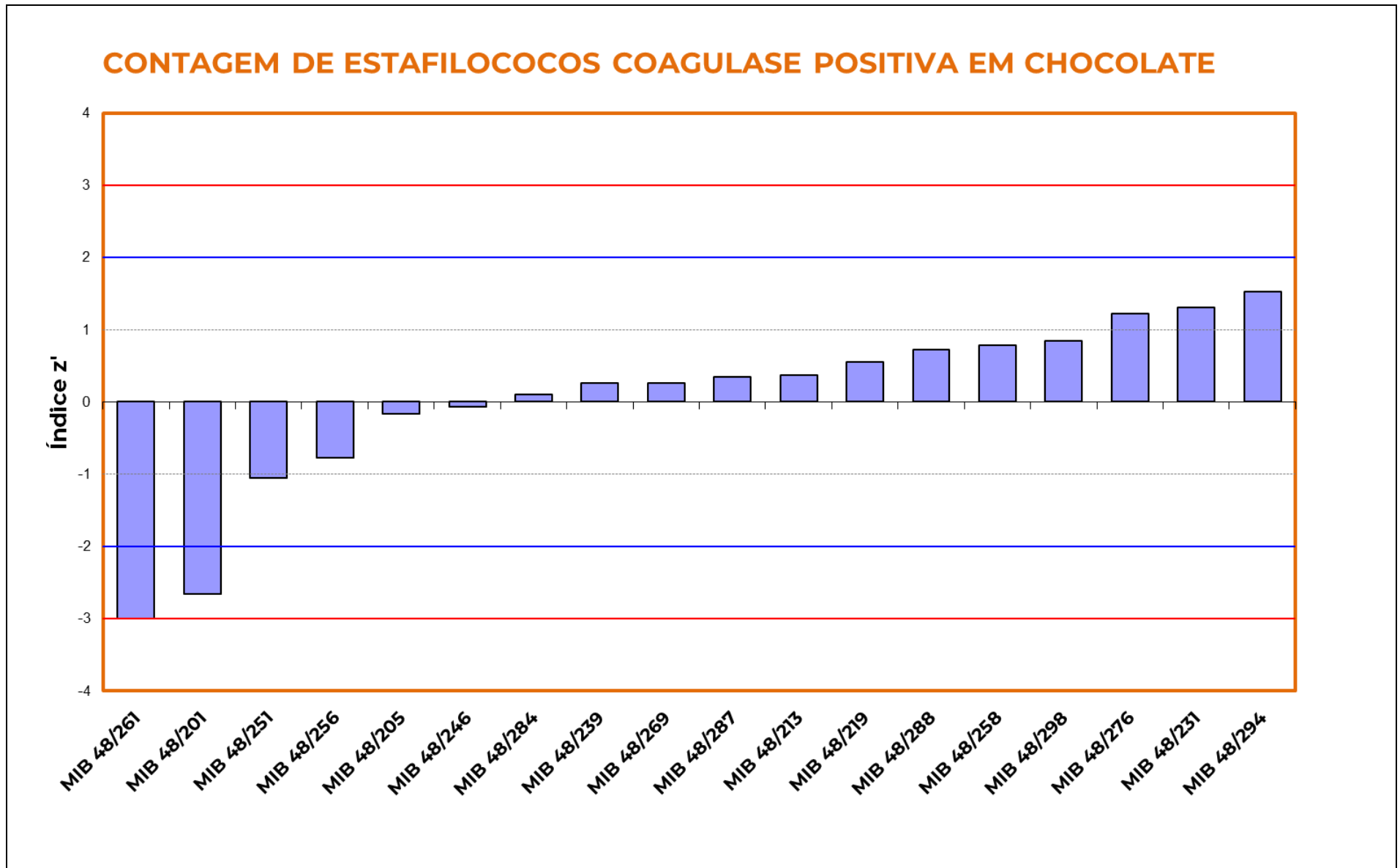
Código dos Laboratórios	Resultados		
	Número do Item de Ensaio	Resultados (UFC.g ⁻¹)	Índice z'
MIB 48/201	207	3400	-2,6
MIB 48/205	211	16000	-0,1
MIB 48/213	216	22400	0,3
MIB 48/219	206	25000	0,5
MIB 48/229	220	Incontável	ND
MIB 48/231	209	40000	1,3
MIB 48/239	205	21000	0,2
MIB 48/246	200	17050	0,0
MIB 48/251	214	9200	-1,0
MIB 48/256	218	11000	-0,7
MIB 48/258	212	29000	0,7
MIB 48/261	203	2720	-3,0
MIB 48/269	208	21000	0,2
MIB 48/276	201	38000	1,2
MIB 48/284	217	19000	0,1
MIB 48/287	204	22000	0,3
MIB 48/288	213	28000	0,7
MIB 48/294	215	46000	1,5
MIB 48/298	202	30000	0,8

ND = Não determinado.

A Figura 1 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 análise crítica dos resultados e implementar, caso necessário, as ações corretivas.

Figura 1: Gráfico de índice z': Estafilococos Coagulase Positiva em chocolate.



7.4. Comentários da CPEP em Relação a Alguns Resultados Enviados

Um laboratório, **MIB 48/229**, relatou resultado não numérico, isto é, “incontável”. Este participante deveria ter utilizado mais diluições para obter um número de colônias que fosse, no máximo, 150, que é o limite recomendado pelo fabricante do Petrifilm®. Desta forma, o resultado relatado pelo participante foi considerado “Insatisfatório”.

8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O número de laboratórios inscritos neste ensaio de proficiência manteve-se praticamente inalterada em relação ao ano anterior e todos os laboratórios enviaram resultados;
- O desempenho dos participantes pode ser considerado **bom**, visto que dezesseis dos laboratórios foram considerados ‘Proficientes’;
- O Formulário de Registro de Resultados foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- A maior parte dos laboratórios, 12 (63,2 %) utilizou o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* em suas mais diversas edições, seguido pela ISO 6888, com três laboratórios (15,8 %) utilizando esta referência.

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 pela Coordenação. Os resultados obtidos poderão ser utilizados em publicações do provedor mantendo evidentemente a confidencialidade.

10. Modificação em Relação a Versão Anterior

Não há Versão anterior deste relatório.

11. Referências Bibliográficas

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. Produção de chocolate em 2021 atinge 693 mil toneladas. Disponível em: <https://www.abicab.org.br/noticias/producao-de-chocolate-em-2021-atinge-693-mil-toneladas/> Acesso em: 17/08/2023.

ABNT ISO GUIA 35. “Materiais de Referência – Guia para Caracterização e Avaliação da Homogeneidade e Estabilidade.” ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2020.

[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 Ensaio de Proficiência, 2011.

ISO 13528. “*Statistical Methods for use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons.*” Geneve: ISO - International Organization for Standardization, 2022.

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

TBCA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). *Food Research Center (FoRC)*. Versão 7.2. São Paulo, 2022. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca> Acesso em: 17/08/2023.

Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R; “*The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories*”. *Pure Appl. Chem.*, pp. 145-196, 2006.

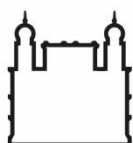
12. Laboratórios Participantes

A lista dos laboratórios que enviaram os resultados à coordenação do Programa está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Laboratórios participantes da 48ª Rodada do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos – Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva em Chocolate.

Instituição
Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto VI / Instituto Adolfo Lutz
CRM Industria e Comercio de Alimentos
Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos
Instituto Adolfo Lutz – CLR de São José do Rio Preto
Instituto Adolfo Lutz – CLR VIII Santo André
Instituto SENAI de Tecnologia em Alimentos e Bebidas – Laboratório de Microbiologia (LAM)
IVISA-RIO/LASP/Laboratório de Microbiologia de Alimentos
Laboratório Central de Saúde Pública do Pará – LACEN PA
Laboratório Central Noel Nutels – Lacen RJ
Laboratório de Bromatologia de Belo Horizonte
Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos – LACEN PE
Laboratório de Microbiologia de Águas e Alimentos / LACEN RS
Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Lacen DF
Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Lacen MS
Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – Lacen GO
Lacen PR – DVLSA – Seção de Microbiologia de Alimentos
Microbiologia de Alimentos / Lacen SC
Núcleo de Ciências Químicas Bromatológicas – CLR – IAL – Araçatuba I
Serviço Microbiologia de Produtos do Lacen MG

- Total de participantes: 19 laboratórios
- **O código de cada participante não está associado à ordem da lista de participantes.**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



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