

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

Microbiologia de Alimentos 49^a Rodada – Contagem de Enterobacteriaceae em Chocolate

Rodada EP MIB 49/23



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde





**Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 49ª Rodada
– Contagem de Enterobacteriaceae 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

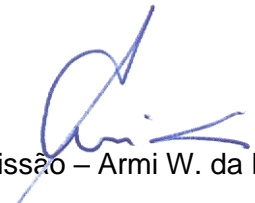
Marcielli Silva Almeida

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 (\bar{x}^*) e suas Incertezas ($u_{\bar{x}^*}$).....	5
4.2. Desvio Padrão para Avaliação de Proficiência.....	5
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
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 49ª Rodada – Contagem de Enterobacteriaceae 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 Enterobacteriaceae 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 *Escherichia coli* depositada na “Coleção de Pesquisa de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ”, identificada como P4328.

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 49ª Rodada do Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos foi enviado um item de ensaio contendo *Escherichia coli*. 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 Enterobacteriaceae 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 3,34 log₁₀ UFC.g⁻¹**.

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

6. Atribuição do Valor Designado

Nesta rodada, nem todos os laboratórios enviaram resultados 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	$S'_{(EP)}$
<i>Escherichia coli</i>	2,78	0,23	0,09	2,32	0,21	0,24

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

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

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

Dezoito laboratórios se inscreveram no Ensaio de Proficiência em Microbiologia de Alimentos 49ª Rodada – Contagem de Enterobacteriaceae em Chocolate - e todos enviaram os resultados dentro do prazo estabelecido.

Entre os laboratórios que enviaram os resultados, dois (11,1 %) são acreditados na norma [ABNT NBR ISO/IEC 17025](#).

Quanto à natureza dos laboratórios, dezesseis (88,9 %) 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 49/300	SSP	CMEE e VRBG	Não	301	240	APHA
MIB 49/301	SSP	VRBG	Não	317	735	APHA (2015)
MIB 49/308	SSP	Meio de cultura TEMPO® EB	Não	316	950	ISO 21528-2
MIB 49/315	SSP	VRBG	Não	314	1000	APHA (2015)
MIB 49/316	SSP	VRBG	Sim	302	1100	APHA (2015)
MIB 49/320	SSP	VRBG	Não	306	435	APHA (2015)
MIB 49/326	SSP	VRBG	Sim	309	830	APHA (2015)
MIB 49/327	SSP	VRBG, TSA e OF	Não	319	840	ISO 21528-2 (2017)
MIB 49/336	AF	Meio de cultura TEMPO® CC	Sim	318	210	AOAC 966.24
MIB 49/338	SSP	VRBG	Não	310	480	APHA
MIB 49/351	SSP	VRBG	Sim	300	660	APHA (2001)
MIB 49/353	SSP	VRBG	Não	307	610	ISO 21528-2 (2017)
MIB 49/355	SSP	VRBG	Não	320	930	APHA
MIB 49/358	SSP	Petrifilm®	Não	311	340	AOAC 2003.01
MIB 49/364	SSP	Petrifilm®	Sim	308	1200	AFNOR 01/06-09/97
MIB 49/377	SSP	VRBG	Sim	304	470	APHA (2015)
MIB 49/379	SSP	VRBG, OFG e Ox	Sim	315	460	ISO 21528-2
MIB 49/380	SSP	Petrifilm®	Sim	313	1100	AOAC 2003.01 (2016)

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

(1) SSP = Solução Salina Peptonada 0,1%; e AF = Água Fosfatada.

(2) CMEE = Caldo Mosse/ Enriquecimento Enterobacteriaceae; OFG = OF glicose; Ox = Oxidase; VRBG = Ágar Bile Vermelho Violeta Glicose; 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.

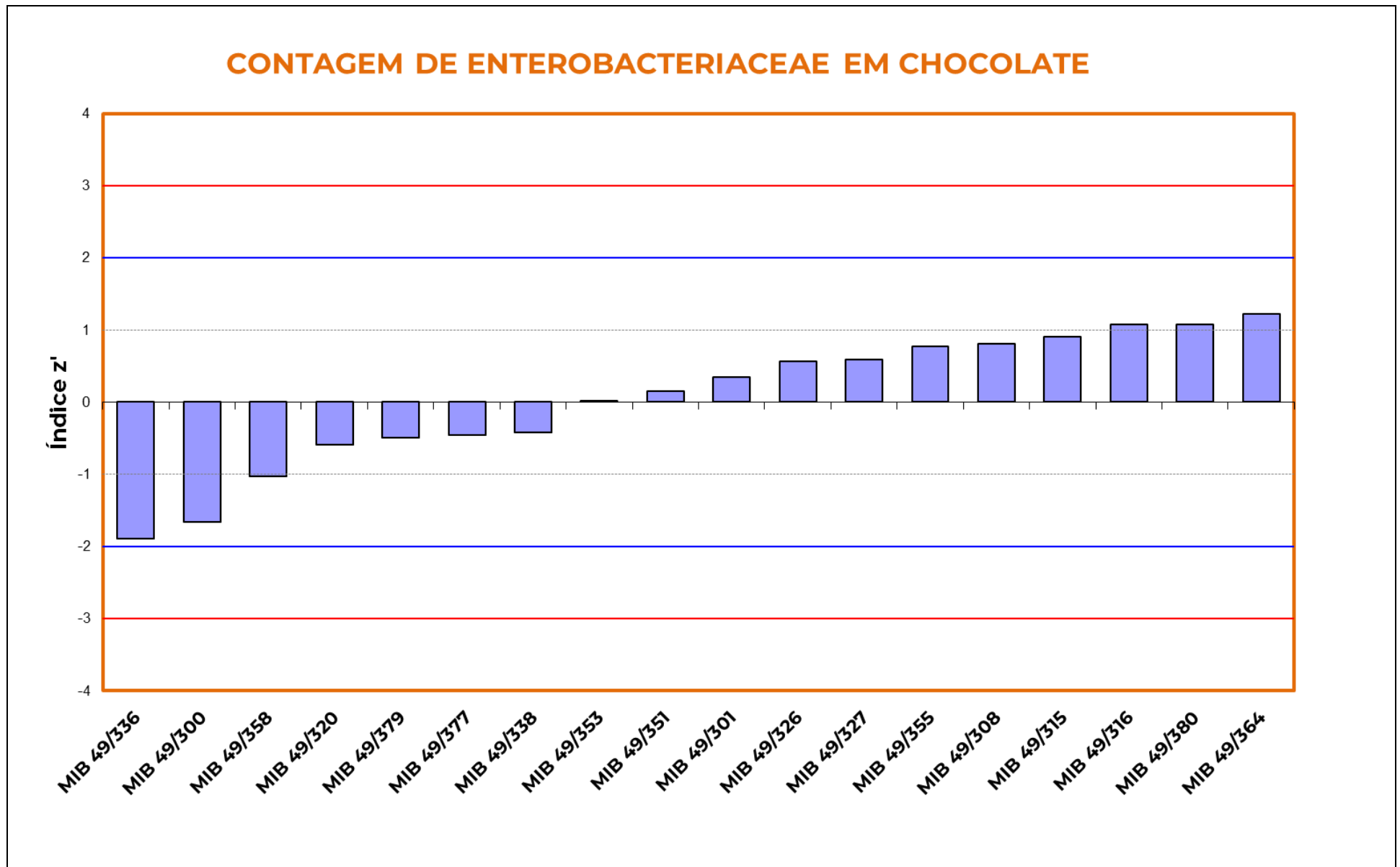
Tabela 3: Valores do índice z' obtidos pelos laboratórios participantes.

Código dos Laboratórios	Resultados		
	Número do Item de Ensaio	Resultados (UFC.g ⁻¹)	Índice z'
MIB 49/300	301	240	-1,6
MIB 49/301	317	735	0,3
MIB 49/308	316	950	0,8
MIB 49/315	314	1000	0,9
MIB 49/316	302	1100	1,0
MIB 49/320	306	435	-0,5
MIB 49/326	309	830	0,5
MIB 49/327	319	840	0,5
MIB 49/336	318	210	-1,8
MIB 49/338	310	480	-0,4
MIB 49/351	300	660	0,1
MIB 49/353	307	610	0,0
MIB 49/355	320	930	0,7
MIB 49/358	311	340	-1,0
MIB 49/364	308	1200	1,2
MIB 49/377	304	470	-0,4
MIB 49/379	315	460	-0,4
MIB 49/380	313	1100	-1,0

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': Enterobacteriaceae em chocolate.



8. Conclusões e Comentários

A análise dos dados obtidos neste EP sugere:

- O desempenho dos participantes pode ser considerado **excelente**, visto que todos os laboratórios obtiveram índice z' "Satisfatório";
- O Formulário de Registro de Resultados foi encaminhado pelos laboratórios participantes e a maioria foi preenchida de forma adequada;
- A maior parte dos laboratórios, 10 (55,5 %) utilizou o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* em suas mais diversas edições, seguido pela ISO 21528-2, com três laboratórios (16,7 %) 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 Ensaaios 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
Eurofins do Brasil Análises de Alimentos LTDA
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
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 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
LANALI
Microbiologia de Alimentos / Lacen SC
Núcleo de Microbiologia / Instituto Adolfo Lutz
Serviço Microbiologia de Produtos do Lacen MG

- Total de participantes: 18 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