



## Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia de Alimentos: 13 anos de ensaios interlaboratoriais

Isabel Campos Cunha<sup>1</sup>, Cristina Belo Correia<sup>1</sup>, Margarida Saraiva<sup>1</sup>, Cláudia Pena<sup>1</sup>, Ana Paula Faria<sup>2</sup>, Maria Antónia Calhau<sup>1</sup>

isabel.cunha@insa.min-saude.pt

(1) Laboratórios de Microbiologia. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Avaliação Externa da Qualidade. Departamento de Epidemiologia, INSA.

### Introdução

Todas as pessoas têm o direito a esperar que os alimentos que consomem sejam inócuos e próprios para consumo (1), sendo a segurança alimentar e a garantia da qualidade objetivos globais. A informação analítica gerada pelos laboratórios da área da microbiologia alimentar é base de tomada de decisões com repercussões quer na área da Saúde, quer na da Economia. Se, por um lado, um resultado falso positivo pode originar uma desnecessária eliminação de um género alimentício, com consequente impacto financeiro, por outro, um resultado falso negativo pode ter sérias implicações em Saúde Pública. Adicionalmente, quantificações inexatas podem originar uma avaliação incorreta, sob o ponto de vista microbiológico, podendo conduzir a posições competitivas desleais (2, 3). Deste modo, há necessidade de obter dados fiáveis e comparáveis, assim como de transmitir uma informação correta, constituindo a participação em esquemas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) / Ensaios de Aptidão, uma importante ferramenta (3). Os Ensaios de Aptidão constituem uma ferramenta imprescindível no Controlo da Qualidade Analítica, na medida em que a avaliação de desempenho fica a cargo de uma entidade independente. Trata-se de uma avaliação de desempenho do laboratório participante através de comparações interlaboratoriais face a critérios pré-estabelecidos (5). A introdução na rotina laboratorial de amostras de conteúdo conhecido do organizador mas não revelado aos laboratórios participantes, é a única forma de deteção de erros sistemáticos através da comparação dos seus resultados com os de outros laboratórios (4).

De acordo com os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025:2005 (6), a garantia da qualidade dos resultados impõe que o laboratório acreditado participe em programas de comparação interlaboratorial. Esta participação obrigatória constitui um dos elementos que permitem demonstrar a competência em cada ensaio, acreditado ou a acreditar (7).

### Objetivos

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem por missão contribuir para ganhos em saúde pública, nomeadamente como laboratório do Estado no setor da saúde, laboratório nacional de referência, em que lhe é reconhecida competência de promover, organizar e coordenar programas de avaliação externa da qualidade no âmbito laboratorial (8).

Neste sentido, através dos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos de Lisboa e Porto, o INSA implementou, em setembro de 2001, um Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade na área da Microbiologia de Alimentos (INSA-PHE *Food EQA Schemes*), inserido num programa a nível mundial que conta com 55 países, coordenado pela *Food and Environmental Proficiency Testing Unit* (FEPTU) da *Public Health England* (PHE), de Londres (à data, *Public Health Laboratory Service* – PHLS, mais tarde *Health Protection Agency* – HPA, integrada na nova organização PHE desde o dia 1 de abril de 2013). Todos os “PHE EQA Schemes” estão acreditados pelo *United Kingdom Accreditation Service* (UKAS) de acordo com a ISO/IEC 17043: 2010. Os ensaios interlaboratoriais organizados pelo INSA, I.P. são aceites pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) (7).

### Material e métodos

O Programa inclui diferentes Esquemas destinados a avaliar o desempenho dos laboratórios em análises específicas de diversos tipos de géneros alimentícios, nomeadamente produtos prontos a consumir, leite e produtos lácteos, marisco e outros produtos do mar, carnes, frutos, etc, assim como alimentos suspeitos de estarem na origem de tox infeções alimentares e superfícies de ambientes de produção/transformação da área alimentar e de manipuladores. São disponibilizados 7 Esquemas que mimetizam a rotina laboratorial de diferentes laboratórios da área alimentar - “laboratório alvo”.



Na **tabela 1** encontram-se detalhadas as características dos diferentes Esquemas: *Standard Scheme*, *Public Health Scheme*, *European Food Legislation Scheme*, *Non-Pathogen Scheme*, *PYM Option (Non-Pathogen Scheme* disponibilizando aos laboratórios uma gama de parâmetros mais reduzida), *Pathogenic Vibrio Scheme*, *Staphylococcus aureus Enterotoxin Scheme* e *Shellfish Scheme*. Este último é organizado em colaboração com o Departamento do Mar e Recursos Marinhos (DMRM) do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

De uma forma geral, os Esquemas de AEQ baseiam-se numa distribuição periódica de amostras, provenientes de um mesmo lote, a serem analisadas por diferentes laboratórios, com interpretação retrospectiva dos resultados (2).

As amostras, preparadas pela PHE, são estáveis e homogêneas, com matriz solúvel em água. Poderão ser misturas liofilizadas de microrganismos ou Lenticulas® (formato único de marca registada), incluindo estirpes "selvagens" de microrganismos e não apenas estirpes de coleção. Após reconstituição, as amostras simulam géneros alimentícios ou superfícies de ambientes de produção/transformação da área alimentar para análise microbiológica, contendo microrganismos em níveis que variam entre 10 unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) e  $10^8$  ufc/g (9). No caso específico do *Staphylococcus aureus Enterotoxin Scheme* as amostras contêm microrganismos em cultura pura. Para evidenciar a homogeneidade do lote das amostras, o Laboratório FEPTU seleciona aleatoriamente 10 frascos (no mínimo) que analisa durante o período de distribuição, para os parâmetros requeridos. Com os resultados destes ensaios de controlo da qualidade são determinados os "Resultados Esperados Preliminares" que constituem uma orientação em relação aos valores esperados, sendo enviados a todos os participantes na semana imediatamente após a data limite de envio dos resultados por parte dos laboratórios. A periodicidade da distribuição destas amostras varia conforme o Esquema (**tabela 1**). A cada distribuição está associado um conjunto de formulários, fornecidos pelo laboratório organizador que regulam e orientam todo o processo.

No final de cada distribuição, cada laboratório participante recebe um relatório completo individual, que inclui a análise conjunta dos resultados de todos os laboratórios participantes a nível mundial, o conteúdo das amostras, resultados esperados, comentários do desempenho específicos para cada amostra e gráficos de distribuição dos resultados. A secção "Resolução de Problemas", também incluída, torna-se de importância relevante na investigação e consequente implementação de ações corretivas caso tenha sido detetado algum problema nos ensaios.

A PHE desenvolveu um sistema de Avaliação de Desempenho (AD), segundo o qual é atribuída pontuação ("score") a ensaios ou grupos de ensaios, de modo a que os participantes possam facilmente efetuar essa avaliação, não só por amostra, mas também ao longo do tempo (10). A finalidade do sistema de pontuação é chamar a atenção para resultados incorretos ou fora da Amplitude Esperada (AE), contribuindo para que os laboratórios identifiquem problemas sistemáticos de uma forma célere. A AD, apresentada no relatório individual após cada distribuição, contempla o desempenho do laboratório nos ensaios ou grupos de ensaios nessa distribuição e nas anteriores correspondentes ao período de participação de um ano no Esquema. A avaliação contínua está implementada na maioria dos esquemas onde uma pontuação cumulativa atribuída a cada ensaio ou grupos de ensaios é comparada com a máxima possível a obter pelo laboratório ao longo desse ano. O Programa disponibiliza ainda uma aplicação informática onde, de forma expedita, o laboratório poderá efetuar uma avaliação de tendências, por ensaio. Neste momento, os laboratórios participantes poderão realizar essa avaliação de tendências de abril de 2005 a dezembro de 2014.

artigos breves\_ n. 12

Tabela 1: Descrição dos INSA-PHE Food EQA Schemes.

Esquema	Laboratório alvo	Descrição	Ensaios requeridos	Avaliação de Desempenho (AD) <sup>(10)</sup>	Nº de distribuições e Nº de amostras (esquema completo / ano)
Standard Scheme	Apropriado para a maioria dos Laboratórios que efetuam análises em géneros alimentícios	Amostras que simulam géneros alimentícios e que englobam ensaios para uma ampla gama de microrganismos patogénicos e indicadores de higiene	<p><b>Pesquisas:</b></p> <p><i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Escherichia coli</i> O157 (estirpes não-toxigénicas) <i>Listeria</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i></p> <p><b>Contagens:</b></p> <p><i>Bacillus cereus</i> presuntivo <i>Clostridium perfringens</i> <i>Campylobacter</i> spp. Estafilococos coagulase positiva <i>Listeria</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> Germes aeróbios mesófilos (CAM) <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> Coliformes</p>	AD por ensaio ou por grupos de ensaios, para cada amostra, na distribuição em curso (PHE scores e z-score) e AD contínua e cumulativa - últimas seis distribuições (PHE scores)	6 distribuições 2 amostras cada
Public Health Scheme	Essencialmente destinado aos Laboratórios de Saúde Pública, nomeadamente Laboratórios de Referência na área	Na sequência da investigação de um surto de toxinfecção alimentar, mediante os dados obtidos no inquérito epidemiológico/ambiental realizado e a descrição das amostras simuladas de géneros alimentícios e de superfícies de ambientes de produção/transformação da área alimentar enviadas, os laboratórios deverão selecionar os ensaios a efetuar e realizar uma apreciação dos resultados obtidos	<p><b>Pesquisas:</b></p> <p><i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp. <i>Escherichia coli</i> O157 (estirpes não-toxigénicas) <i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Yersinia</i> spp. / <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Listeria</i> spp. / <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Vibrio</i> spp. / <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Estafilococos coagulase positiva</p> <p><b>Contagens:</b></p> <p><i>Bacillus</i> spp. / <i>Bacillus cereus</i> presuntivo <i>Clostridium</i> spp. / <i>Clostridium perfringens</i> <i>Campylobacter</i> spp. Estafilococos coagulase positiva <i>Listeria</i> spp. / <i>Listeria monocytogenes</i> Germes aeróbios mesófilos (CAM) <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i></p>	AD por ensaio, para cada amostra, na distribuição em curso (PHE scores e z-score)	3 distribuições 6 amostras cada

artigos breves\_ n. 12

Esquema	Laboratório alvo	Descrição	Ensaio requerido	Avaliação de Desempenho (AD) <sup>(10)</sup>	Nº de distribuições e Nº de amostras (esquema completo / ano)
European Food Legislation Scheme	Indicado para os Laboratórios que examinam géneros alimentícios de acordo com a legislação europeia especificada no Regulamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a Critérios Microbiológicos Aplicáveis aos Géneros Alimentícios e subsequentes alterações, tendo em conta o Regulamento (CE) Nº 852/2004	Descrição do género alimentício a ser analisado de acordo com a legislação. Os laboratórios deverão selecionar os ensaios necessários para verificar se a amostra está de acordo com os critérios de segurança dos géneros alimentícios ou de higiene dos processos e interpretar os resultados de forma a concluir quanto à conformidade do lote	<p><b>Pesquisas:</b></p> <p><i>Salmonella</i> spp. <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>S. Typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Cronobacter sakazakii</i> <i>Enterobacteriaceae</i></p> <p><b>Contagens:</b></p> <p><i>Bacillus cereus</i> presuntivo Estafilococos coagulase positiva <i>Listeria monocytogenes</i> Germes aeróbios mesófilos (CAM) <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i></p>	AD por ensaio, para cada amostra, na distribuição em curso (PHE scores) e AD contínua e cumulativa - últimas quatro distribuições (PHE scores)	4 distribuições 3 amostras cada
Shellfish Scheme	Aconselhado para laboratórios que realizem ensaios em produtos da pesca, de aquacultura e ambientes afins, nomeadamente Laboratórios Nacionais de Referência na área	As amostras simulam moluscos bivalves crus e outros produtos do mar provenientes de locais de apanha/cultivo de acordo com o Regulamento (CE) Nº 854/2004 e da cadeia de produção entre a apanha e o consumo, de acordo com o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a Critérios Microbiológicos Aplicáveis aos Géneros Alimentícios e subsequentes alterações	<p><b>Pesquisas:</b></p> <p><i>Salmonella</i> spp.</p> <p><b>Contagens:</b></p> <p><i>Escherichia coli</i> (Número Mais Provável - NMP)</p>	AD por ensaio, para cada amostra, na distribuição em curso (PHE scores) e AD contínua e cumulativa - últimas três distribuições (PHE scores)	3 distribuições 2 amostras cada
Non - Pathogen Scheme	Adequado para laboratórios onde não é aconselhável a presença de microrganismos patogénicos	Amostras que simulam géneros alimentícios para ensaios de quantificação de indicadores de deterioração e estudos do prazo de validade	<p><b>Contagens:</b></p> <p>Germes aeróbios mesófilos (30 °C) Germes aeróbios (22 °C) <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Escherichia coli</i> Coliformes <i>Enterococcus</i> Bactérias ácido-láticas <i>Pseudomonas</i> spp. presuntivo Leveduras Bolores</p>	AD por ensaio, para cada amostra, na distribuição em curso (PHE scores e z-score) e AD contínua e cumulativa - últimas três distribuições (PHE scores)	3 distribuições 3 amostras cada
Non - Pathogen PYM Option		Amostras que simulam géneros alimentícios para ensaios de quantificação de indicadores de deterioração mas que permitem a análise de uma gama de parâmetros mais reduzida	<p><b>Contagens:</b></p> <p><i>Pseudomonas</i> spp. presuntivo Leveduras Bolores</p>		

artigos breves\_ n. 12

Esquema	Laboratório alvo	Descrição	Ensaio requerido	Avaliação de Desempenho (AD) <sup>(10)</sup>	Nº de distribuições e Nº de amostras (esquema completo / ano)
<b>Pathogenic Vibrio Scheme</b>	Essencialmente para laboratórios que pretendam enumerar e/ou pesquisar <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio cholerae</i> (estirpes não-toxigénicas) em géneros alimentícios	Amostras que simulam géneros alimentícios para ensaios de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> e <i>Vibrio cholerae</i> (estirpes não-toxigénicas)	<b>Pesquisas e Contagens:</b> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Vibrio cholerae</i> (estirpes não-toxigénicas) <i>Vibrio vulnificus</i>	Não aplicado	3 distribuições 2 amostras cada
<b>Staphylococcus aureus Enterotoxin Scheme</b>	Laboratórios que pretendam efetuar a pesquisa e identificação de enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i> em géneros alimentícios	Amostras que simulam géneros alimentícios para pesquisa e identificação de enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Pesquisa das enterotoxinas de <i>S. aureus</i> e identificação do tipo de toxinas	Não aplicado	3 distribuições 2 amostras cada

**\_Resultados**

O Programa Nacional iniciou com 23 laboratórios participantes e em 2013/14 (abril 2013 a março 2014) contou com a participação de 46 laboratórios (tabela 2). Estamos perante uma área de trabalho interdisciplinar por excelência, que contempla laboratórios públicos e privados: de Saúde Pública, de Controlo Oficial dos géneros alimentícios, da Indústria, de Estabelecimentos de Ensino / Investigação e de Prestação de Serviços (gráfico 1). Os laboratórios participantes são provenientes de diversas regiões de Portugal continental e dos arquipélagos dos Açores e da Madeira, incluindo, desde 2010, um laboratório de Angola (figura 1).

Gráfico 1: Tipo de Laboratórios participantes (2013/14).

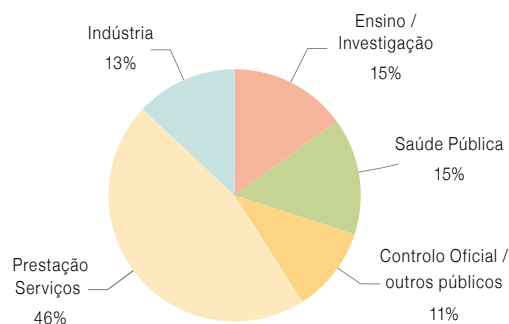


Tabela 2: Distribuição dos Laboratórios participantes pelos diferentes Esquemas (2001-2014).

	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
<b>Standard Scheme</b>	18	19	25	26	27	27	29	31	34	38	41	42	42
<b>Public Health Scheme</b>	5	6	4	4	6	6	6	6	4	4	2	2	2
<b>Shellfish Scheme</b>	3	4	4	5	5	7	7	7	5	5	5	5	6
<b>European Food Microbiology Legislation Scheme</b>	0	1	1	1	1	5	2	3	3	5	4	3	4
<b>Pathogenic Vibrio Scheme</b>	0	1	0	2	2	0	2	2	1	1	2	1	2
<b>S. aureus Enterotoxin Scheme</b>	0	0	2	1	0	0	0	2	1	4	3	3	3
<b>Non-Pathogen Scheme</b>	0	0	2	1	0	0	0	2	1	6	3	1	1
<b>Non-Pathogen Scheme / PYM Option</b>											5	7	8
<b>Nº de Laboratórios participantes</b>	23	27	32	35	37	39	43	41	41	49	49	48	46





artigos breves\_ n. 12

No **gráfico 2** pode visualizar-se o desempenho dos laboratórios participantes no “INSA-PHE *Standard Scheme*”, em 2013/14; distribuição dos laboratórios por percentagem da pontuação total cumulativa obtida relativamente à máxima possível, na análise de Patógenos e na Contagem de germes Aeróbios Mesófilos (CAM) e de Indicadores (*Enterobacteriaceae*, coliformes e *E. coli*).

Nas seis distribuições decorridas para o *Standard Scheme*, os 41 laboratórios que enviaram resultados demonstraram um desempenho >70% na pontuação total cumulativa correspondente à totalidade dos ensaios efetuados na análise de Patógenos: 17 demonstraram um desempenho de 100%, 16 um desempenho (90%-99%), 6 um desempenho (80%-89%) e 2 um desempenho (70%-79%).

No mesmo período, para Contagem de germes Aeróbios Mesófilos (CAM), 31/41 laboratórios demonstraram um desempenho de 100% na pontuação total cumulativa, 6 um desempenho (70%-99%) e 4 um desempenho <70%.

Relativamente à contagem de Indicadores, 11 demonstraram um desempenho de 100%, 8 um desempenho (90%-99%) 9 um desempenho (80%-89%) e 4 um desempenho (70%-79%), tendo 9 apresentado um desempenho <70%.

## Conclusões

É reconhecida pelas autoridades e comunidade científica internacional a importância dos ensaios interlaboratoriais. Sendo o Controlo da Qualidade Analítica um dos elementos mais relevantes dentro de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ), a Avaliação Externa da Qualidade / Ensaios de Aptidão constitui uma ferramenta essencial na medida em que contribui para evidenciar a eficácia desse mesmo SGQ.

Uma característica dos Programas AEQ é oferecer aconselhamento/ consultoria aos participantes que o solicitem, promovendo a melhoria da qualidade (5). A existência de um Programa Nacional facilita esta interligação e permite atingir esse objetivo.

A diversidade é a maior parceira do progresso. O número de laboratórios que participam no Programa Nacional tem crescido ao longo dos anos e o tão variado tipo de participantes, concretiza um dos objetivos do Programa – ser um ponto de convergência, de diálogo, de formação e de troca de experiências e de preocupações, transversais aos laboratórios da área da Microbiologia Alimentar.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer, especialmente, às colegas:

Maria do Rosário Novais, responsável pelo início da participação dos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do INSA no Programa de AEQ organizado pelo PHLS (atual PHE) e que promoveu a constituição da parceria entre as duas instituições;

Maria Isabel Santos, que se empenhou na concretização do Programa Nacional, implementando-o e coordenando-o até 2008, permanecendo desde aí como consultora do mesmo;

Ana Paula Melo, por todo o seu empenho, trabalho e dedicação ao longo destes anos;

Sónia Pedro, colega do Departamento do Mar e Recursos Marinhos (DMRM) do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pela sua colaboração na organização do “INSA-PHE *Shellfish EQA Scheme*”.

## Referências bibliográficas:

- (1) Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene, CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Rome, FAO/OMS, 2003.
- (2) Lightfoot NF, Maier EA (eds). Microbiological Analysis of Food and Water: guidelines for quality assurance. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. [LINK](#)
- (3) Campos Cunha I, Santos MI, Saraiva MM, et al. Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia dos Alimentos – Ano VI. Rev Port Farmac. 2006;52(3, Supl.):73.
- (4) Santos MI, Campos Cunha I. A importância da Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia dos Alimentos. Rev Port Farmac. 2006;52(3, Supl.):22.
- (5) ISO/IEC 17043:2010 - Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. Geneva: International Organization for Standardization, International Electrotechnical Committee, 2010.
- (6) NP EN ISO IEC 17025:2005 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Caparica: Instituto Português da Qualidade, 2005.
- (7) Instituto Português de Acreditação. DRC005 - Procedimento para Acreditação de Laboratórios, 10/4/2012. Caparica: IPAC, 2012. [LINK](#)
- (8) Decreto-Lei 27/2012, 8 de fevereiro. DR 1ª Série, nº 28: 635-639. Aprova a orgânica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P.
- (9) Public Health England. Food and Environmental Proficiency Testing Unit. Proficiency testing for food and water microbiology. London: Public Health England, 2013. (PHE publications nº 2013093). [LINK](#)
- (10) Public Health England. Food and Environmental Proficiency Testing Unit. PHE food and water PT schemes: a guide to the scoring systems and statistics used for the PHE proficiency testing Schemes for Food and Water Microbiology. London: Public Health England, 2014. (FEPTU 562.06) [LINK](#)