

**Perfil dos participantes do PEP em Microbiologia da RMRS
&
Técnicas/ metodologias do ensaio de
BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS**

O perfil do grupo foi baseado em questionário organizado pela Rede Metrológica e Grupo Técnico da Microbiologia.

A pesquisa continha 21 questões de múltipla escolha, com espaço para argumentação dos laboratórios.

Após o preenchimento, os laboratórios entregaram seus questionários na coleta presencial de **22/09/2015** no DEAL/Corsan.

Foi solicitado que estivessem identificados com o código/usuário no programa para manter o anonimato e proporcionar a correlação de resultados nas rodadas do programa.

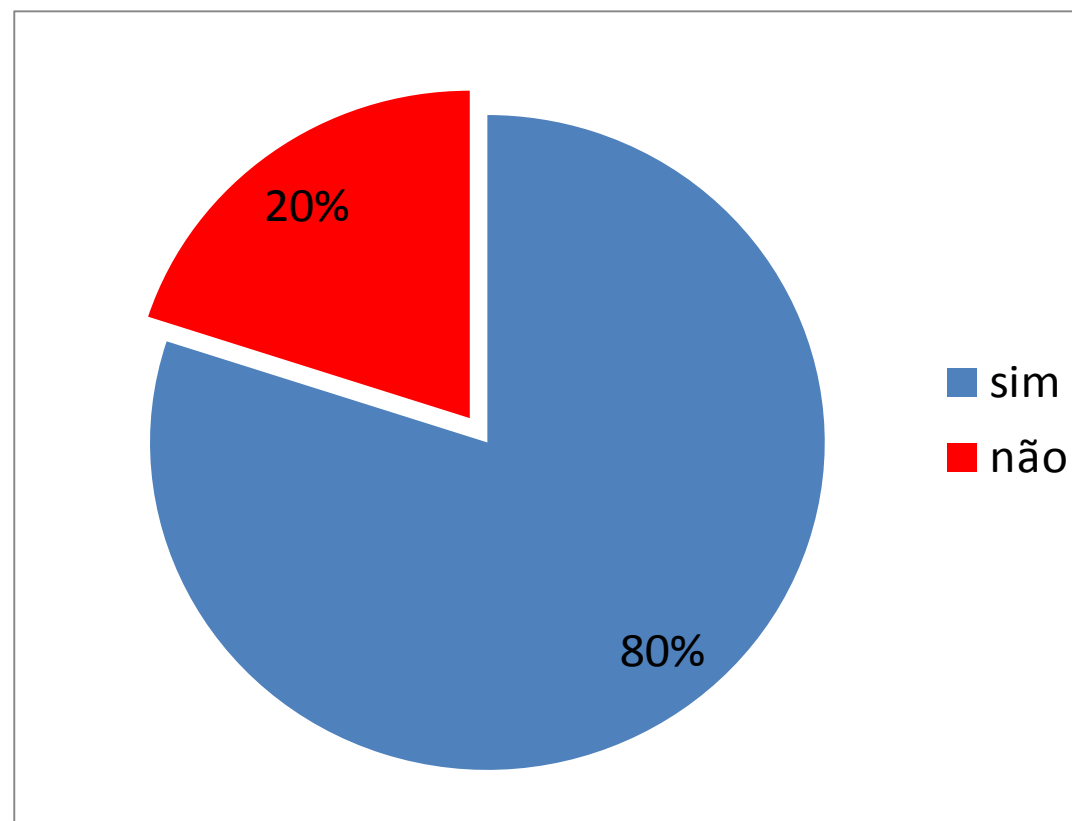
Os resultados de 25 laboratórios foram compilados.

O objetivo da pesquisa foi conhecer detalhes das técnicas que o grupo de laboratórios utiliza e avançar no estudo de equivalência para o ensaio de Bactérias Heterotróficas.

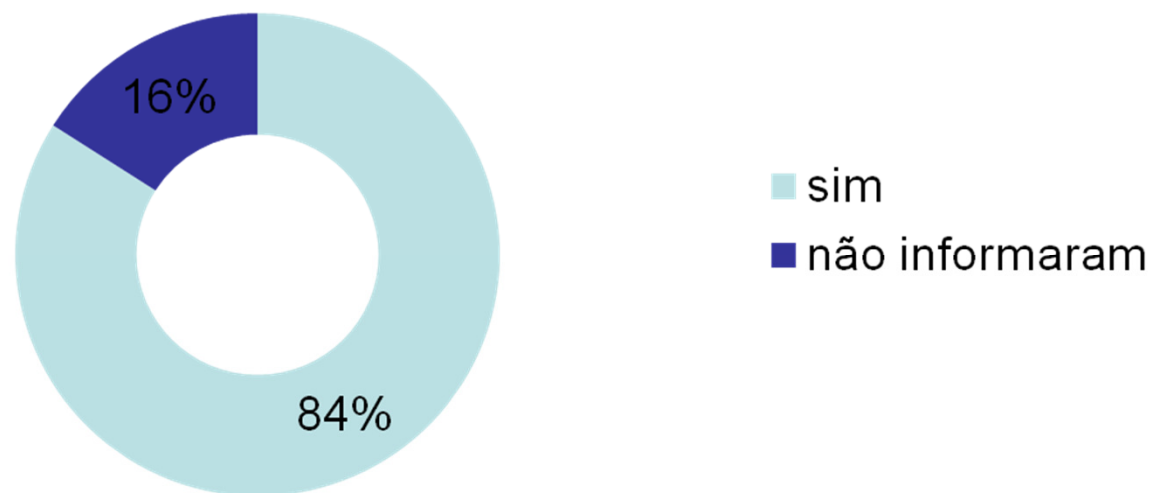
O objetivo desta exposição é divulgar resultados, motivar discussão e equalizar conhecimentos.

Gestão da qualidade e Controle ambiental

1.O laboratório tem **programa de gestão da qualidade** implementado? página 9-5



2. Após a **chegada ao laboratório** as amostras são armazenadas em geladeira?

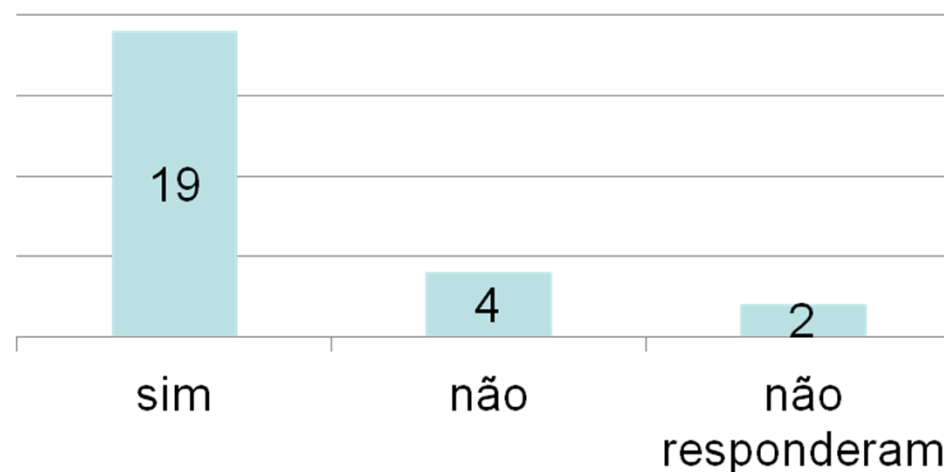


O **Standard Methods (22ª edição)** – indica a necessidade de refrigeração a menos de 8°C durante o transporte das amostras.

Nas páginas **9-9** e **9-28** indica a temperatura e monitoramento da geladeira de 2 a 8°C.

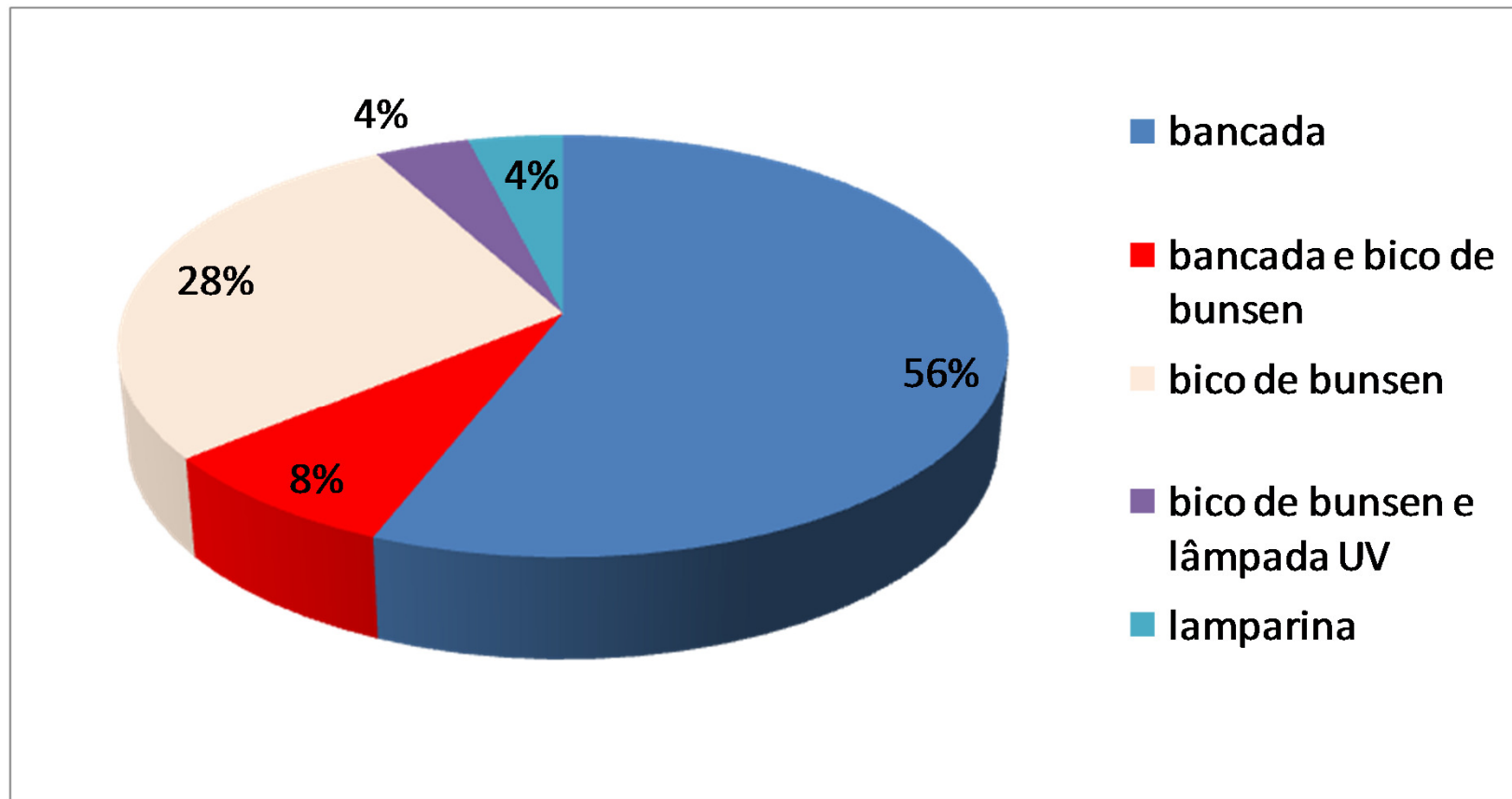
5 laboratórios que informaram a temperatura da geladeira estão em desacordo com Standard Methods .

3. O laboratório realiza **controle ambiental da área de inoculação** segundo o Standard Methods?



3 laboratórios que não realizam controle ambiental, afirmaram que tem programa de gestão de qualidade e seguem o Standard Methods. página 9-7

13. Na área de inoculação, o laboratório utiliza:



Técnica do ensaio Bactérias heterotróficas

4. O laboratório utiliza a técnica?

16 (64%) – Pour plate

5 (20%) – Spread plate

Um laboratório citou técnica Pour plate e tubos múltiplos, e outro Pour plate e substrato enzimático P/A e cartela. A pesquisa era exclusivamente para o ensaio de bactérias heterotróficas!

5. A técnica é baseada no Standard Methods 22^a ed.?

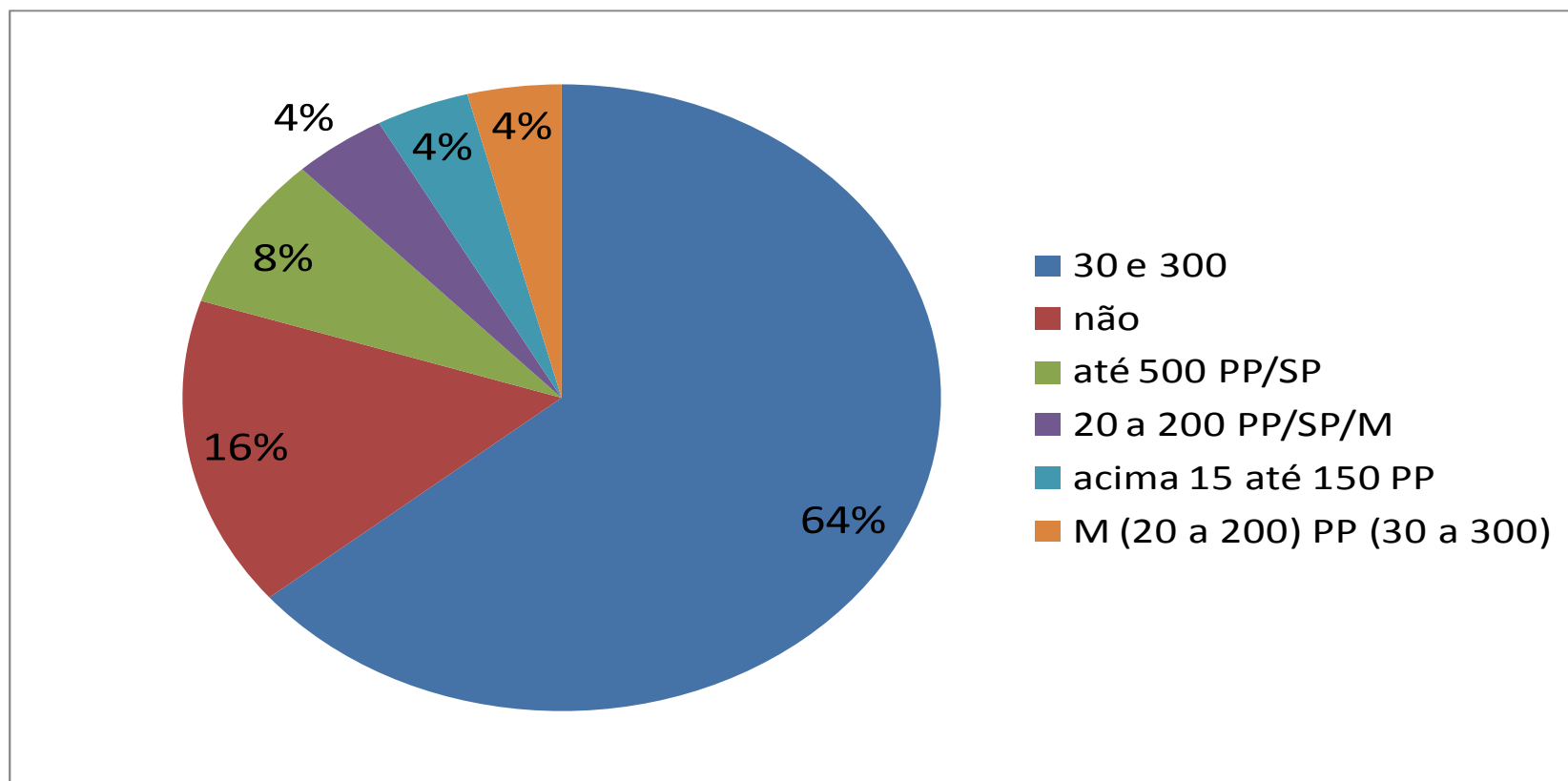
23(92%) – sim 1(4%) – 21^a edição 1(4%) – Portaria 62 MAPA

20 – O laboratório utiliza contador de colônias com lupa ou lente de aumento? página **9-27**

24 (96%) – sim

1(4%) – não

21. Existe faixa de contagem ideal estabelecida pelo laboratório. Se sim, qual é esta faixa?

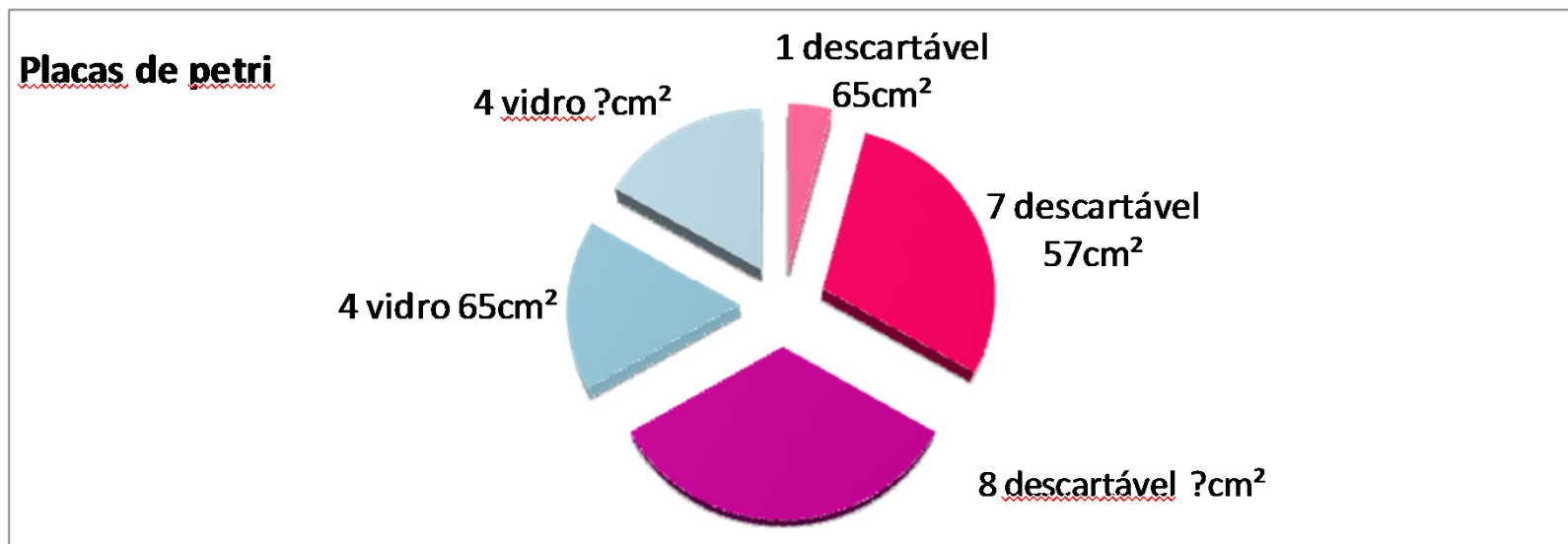


PP/SP 30 a 300 página 9-51

M 20 a 200 página 9-56

Materiais:

6. O laboratório utiliza os materiais:



Pipetas:

13 (52%) – micropipetas

5 (20%) – pipetas de vidro

4 (16%) - pipetas de vidro e micropipetas

1 (4%) - pipetas de vidro e **pipetador automático (pera de sucção?)**

3 (12%) - não informaram

Dos 3 laboratórios que não informaram se usam pipetas ou micropipetas, 2 usam placas descartáveis e um laboratório usa placas de vidro, todos realizam a técnica Pour plate. **(como a amostra é transferida?)**

7. O material esterilizado passa por controle de qualidade?

20 (80%) – sim

5 (20%) – não

Dos 5 laboratórios que não realizam controle de qualidade do material esterilizado, 4 afirmaram que tem programa de gestão de qualidade.

14 – A água de diluição utilizada é preparada:

19 (76%) – conforme Standard Methods

2 (8%) – não utilizam (placas descartáveis, Spread plate) – **não fazem diluições?**

1 (4%) – comprada pronta para uso

1 (4%) – conforme ISO

2 (8%) – Utilizam água estéril, mas não mencionaram como preparam – **usam**

tamponante?

página 9-32

Meios de cultura

8/9. O meio de cultura utilizado no ensaio é:

- 23 (92%) – PCA
- 1 (4%) - (AGAR TRIPTONA DE CASEÍNA/GLICOSE/EXTRATO DE LEVEDURA – Pour plate)
- **1 (4%) – PCA e m-HPC Agar**

O laboratório que afirmou usar PCA e m-HPC Agar usa as técnicas Pour plate e membrana filtrante. Um laboratório que afirmou usar PCA, também citou Caldo lauril, verde brilhante e Ec mug.

- 21 (84%) – preparado no laboratório
- 3 (12%) – compram pronto para uso (2 Spread plate/placa desc., 1 Pour plate/placa desc.)
- **1 (4%) - prepara e compra pronto para uso (mesmo laboratório que citou substrato e cartela nas técnicas)**

10. Armazenamento do meio:

Geladeira	Temperatura ambiente
9 (36%) tubos	1 (4%) tubos
8 (32%) frascos	1 (4%) frascos
1 (4%) placas (spread plate)	

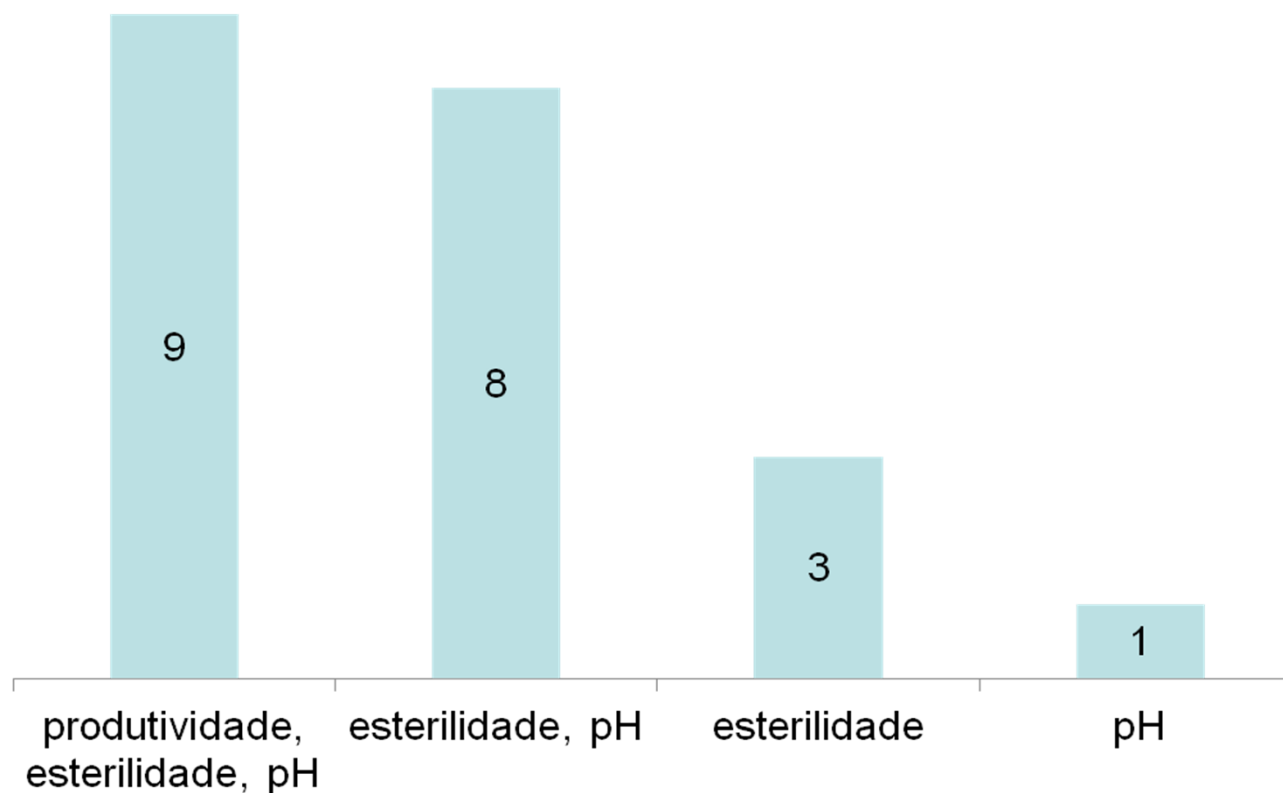
- **1 (4%) - tubos e placas na geladeira, PCA preparado no laboratório, Pour plate (placas vazias guardadas na geladeira?)**
- **1 (4%) – tubos a 20°C - placas descartáveis , substrato, Pour plate**
- 3 (12%) - não prepara meio e usam placas descartáveis

11. Esterilização do meio:

- 19 (76%) - 15min a 121°C
- **1 (4%) -12min 127°C (PCA)**
- **1 (4%) -15min 121±3°C (PCA e m-HPC Agar)**
- **1 (4%) – 30 min a 121°C (PCA)**
- 3 (12%) - não preparam meio

Página 9-15

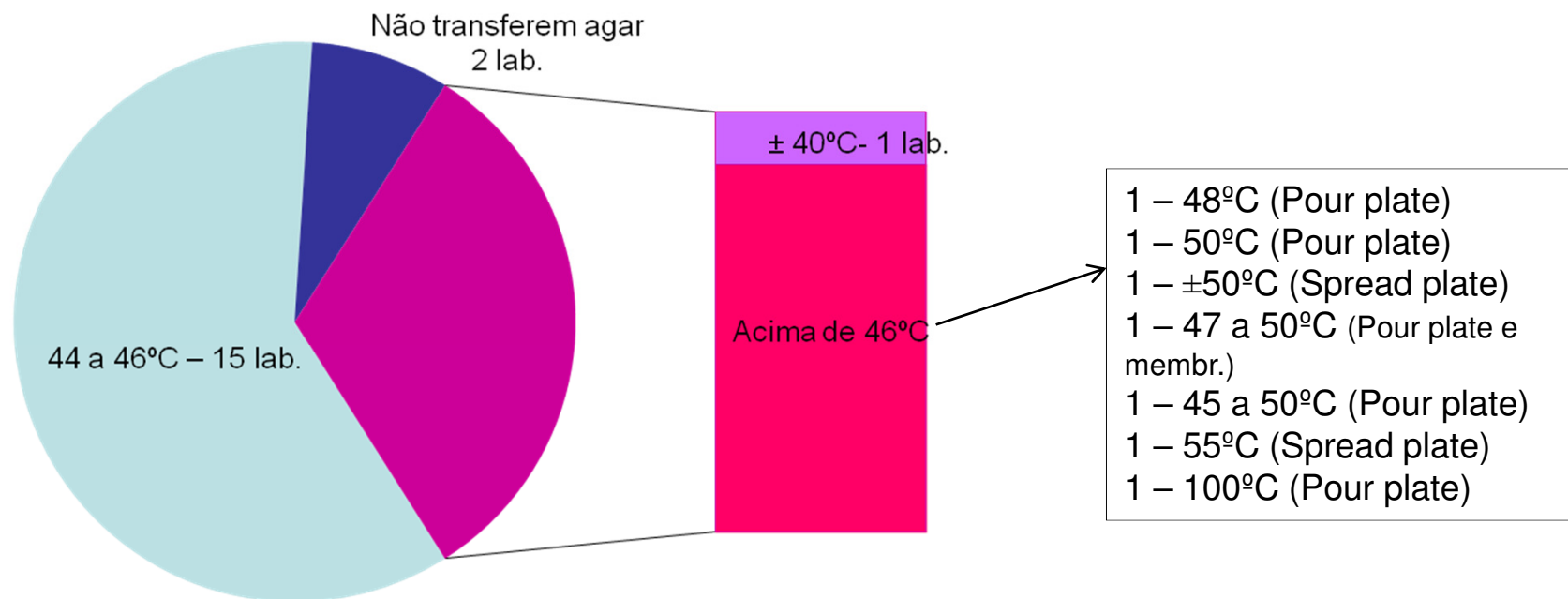
12. Se o meio de cultura é preparado no laboratório, ele passa por controle de qualidade de acordo com Standard Methods?



- 2 (8%) – não prepara meio
- **1 (4%) – não realiza controle de qualidade**

Inoculação

15/16. Temperatura do agar fundido a ser transferido para placas:



Os laboratórios que transferem agar para placas, usam:

- 18 (72%) –termômetro /controlador digital calibrado
- 3 (12%) –termômetro /controlador digital não calibrado
- 1 (4%) – assinalou controlado por termômetro ou controlador digital não calibrado e outro, sem mencionar o que é outro
- **1 (4%) - teste de estabilidade na pele**

página 9 - 53

Incubação

17/18. Temperatura das estufas de incubação:

- 24 (96%) –termômetro ou controlador digital calibrado
- 1 (4%) – não calibrado (sem gestão da qualidade implementado)

- 11 (44%) - $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- 7 (28%) – 35°C
- 2 (8%) – $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 2 (8%) - $35\pm 2^{\circ}\text{C}$
- 3 (12%) – 36°C (1 Portaria MAPA)

19. Período de incubação:

- 23 (92%) – 48h
- 1 – $48\text{h}\pm 3\text{h}$
- **1 – $24\text{h}\pm 2\text{h}$ (Spread plate/placa descartável/PCA comprado pronto/ 35°C)**

Página 9 – 10 e 9 – 51
 35°C 48h ou 20 a 28°C 5 a 7 dias

Perfil dos participantes do PEP em Microbiologia da RMRS

- 80% tem programa de gestão da qualidade
- 84% conservam suas amostras em geladeira
- 76% controlam o ambiente da área de inoculação
- 96% usam bancada, bico de bunsen, lâmpada UV ou todos
- 64% usam técnica Pour plate e 20% Spread plate
- 92% usam o Standard Methods 22^a ed.
- 96% usam contador com lupa
- 64% usam placas descartáveis e ao menos metade destes com 57cm²
- 52% usam exclusivamente micropipetas
- 80% realizam controle de qualidade do material esterilizado
- 76% preparam água de diluição conforme Standard Methods
- 96% usam PCA
- 84% preparam seu meio de cultura
- 72% guardam o meio estéril em geladeira (36% em tubos e 32% em frascos)
- 76% esterilizam o meio por 15min a 121°C
- 39% testam produtividade, esterilidade e pH do meio
- 88% controlam a temperatura de transferência do agar
- 50% transferem o agar em 44 a 46°C
- 96% possuem estufas com termômetro/ controlador calibrado
- 96% incubam por 48h
- E todos incubam de 34 a 36°C

Conclusões/ações:

- O perfil dos laboratórios é muito variado e na presente pesquisa não foi possível correlacionar resultados com procedimentos, mas...
- Os pontos indicados em vermelho na página anterior são os mais frágeis do grupo e devem ser os primeiros a demandar atenção dos laboratórios
 - Programa de gestão da qualidade (80%)
 - Controle de qualidade do material esterilizado (80%)
 - Preparação do meio de cultura (variação)
 - Controle da temperatura de transferência do agar (88%)
 - Temperatura de transferência do agar (variação)

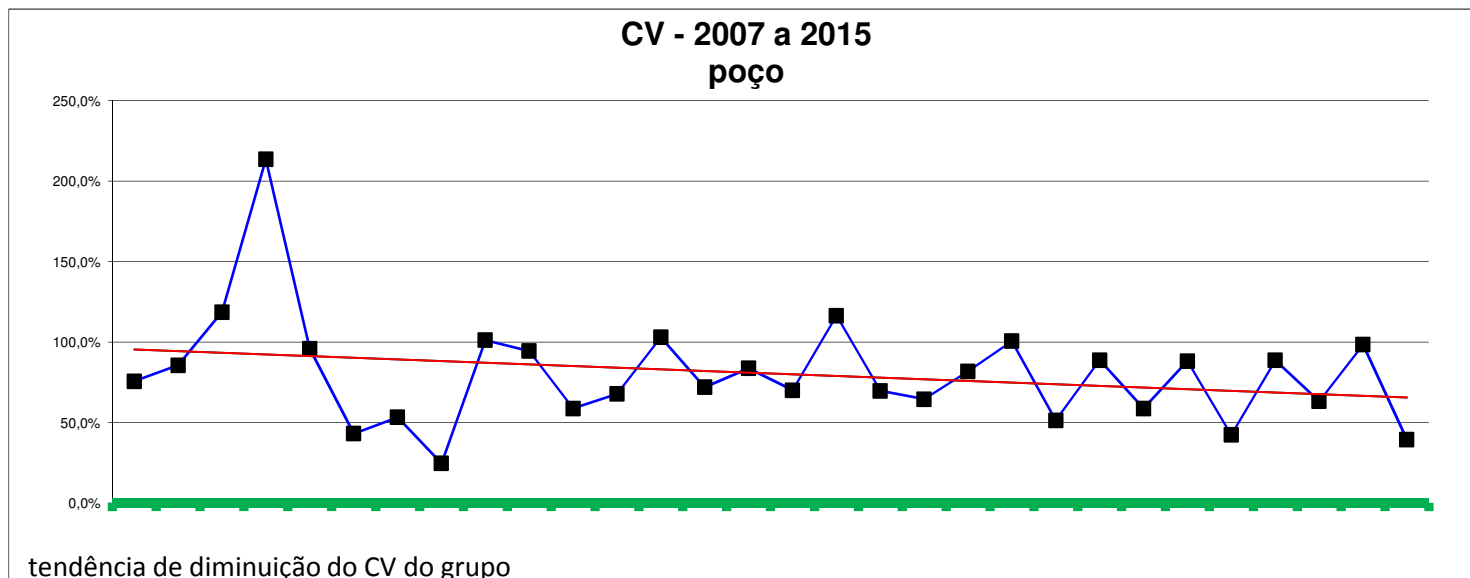
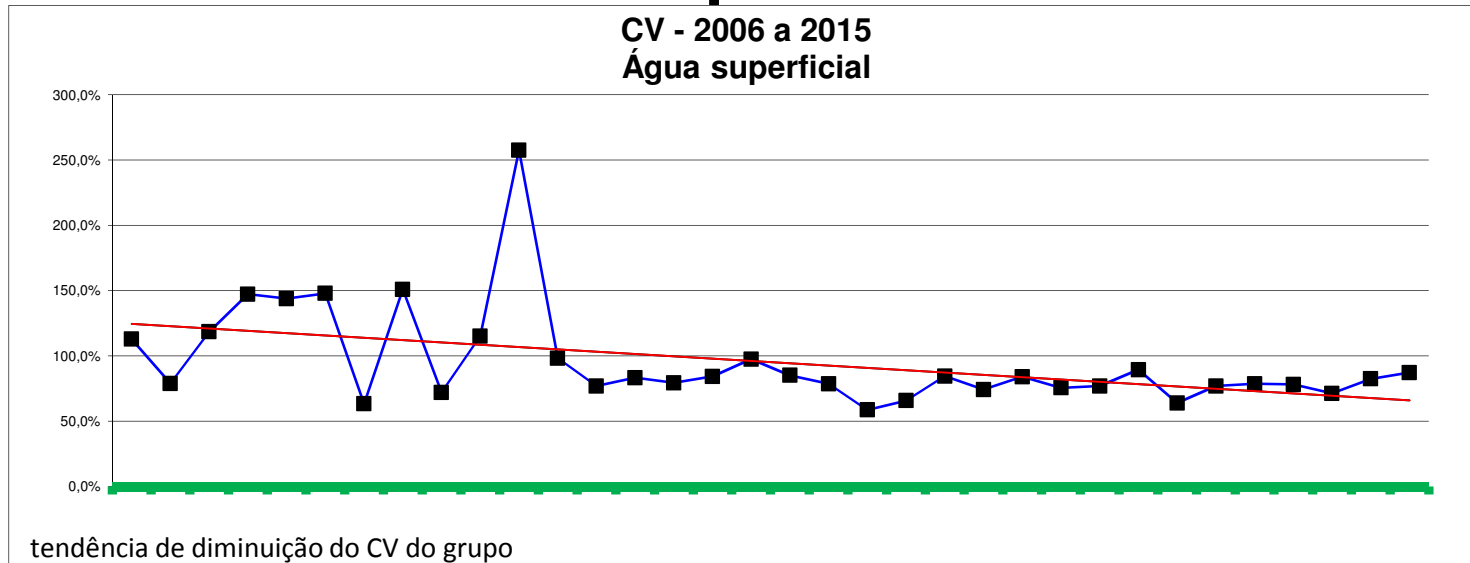
- Com relação ao “exercício” de leituras de placas utilizando fotos, realizado entre 2014 e 2015.....

**CV das rodadas de fotos e presenciais demonstra
tendência de diminuição.**

(exatidão do grupo melhorou!?)

Nenhum dos pontos frágeis destacados foi exercitado com as rodadas de fotos!

Rodadas presenciais:



Rodadas com fotos:

CV fotos	
2014 1ª R	13,42% e 36,47%
2014 2ª R	12,52% e 10,28%
2015 1ª R	16,72% e 9,58%
2015 2ª R	4,06% e 2,35%

- Nas rodadas **presenciais**, o número de laboratórios com resultados **insatisfatórios ou questionáveis de exatidão**, não alterou:

	1ª R 2014	2ª R 2014	1ª R 2015	2ª R 2015
Superficial	4	5	4	6
Poço	7	5	7	5

- **Novas propostas?**

Equivalência dos ensaios de CT e *E. coli*:

Conforme alguns estudos* sobre **equivalência**:

- Em amostras tratadas ou com pouca contaminação, os métodos enzimático e convencional (FTM) se mostram equivalentes para coliformes totais e *E. coli*. **Ecossistema pobre**

***Exemplo de estudo comparativo:**

MARQUEZI, Marina Chiarelli; GALLO, Cláudio Rosa; DIAS, Carlos Tadeu dos Santos. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo, v.69, n.3, 2010. Disponível em <<http://periodicos.ses.sp.bvs>>. acesso em 21/10/2015

- Na segunda rodada de nosso Programa, no parâmetro coliformes totais de água de poço, amostra de menor contaminação, a homogeneidade foi realizada com ensaio quantitativo e todas as duplicatas apresentaram positividade, com a média:

(15,8) 16 NMP/100mL

Podemos afirmar que o LDM/LQM do grupo é $\leq 16\text{NMP}/100\text{mL}$!

Nesta rodada, três laboratórios não detectaram presença de CT, podemos afirmar que apresentaram **LDM/LQM** maior que 16 NMP/100mL.

Isto pode demonstrar que não há equivalência??
ou evidenciar detalhes a melhorar nos ensaios??

Ainda conforme alguns estudos*:

- Na análise de **coliformes totais** em amostras de água do rio, o método FTM difere significativamente dos métodos enzimáticos. Como este ensaio quantifica um grupo que pode ser muito variável, esta diferença pode ser relacionada a presença ou não de *Aeromonas* (*eventual reação ONPG positiva*) ou pela maior capacidade dos substratos em recuperar as células danificadas;
- Na análise de ***E. coli***, ao contrário do observado para a análise de coliformes totais, não há diferença significativa entre os métodos utilizados. Esta equivalência pode ser explicada pela capacidade similar dos meios de cultura em quantificar uma única espécie.

A equivalência de métodos de ensaios Microbiológicos depende do conhecimento do ecossistema e das delicadas condições ambientais da amostra em estudo.

Determinar a equivalência em nosso grupo é importante, a medida que, este conhecimento é ampliado em um estudo a campo como este.

Além de determinar população, delimitamos até que ponto os métodos equivalem nesta determinação para o ecossistema de estudo, neste caso, o Lago Guaíba.

Porém, é necessário diminuir os desvios técnicos antes de comparar os resultados no grupo.