



## DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE PROFICIÊNCIA EM BANCOS DE LEITE HUMANO: DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS EM LEITE HUMANO.

Silva JB<sup>1</sup>, Bricio SML<sup>2</sup>, Rosas CO<sup>2</sup>, Brandão MLL<sup>2</sup>, Medeiros VM<sup>2</sup>, de la Cruz MHC<sup>2</sup>, Silva CC<sup>2</sup>, Silva DA<sup>1</sup>, Almeida JAG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Fernandes Figueira - IFF/Fiocruz, <sup>2</sup>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/Fiocruz

### Introdução

O leite humano (LH), por suas inúmeras características e potencialidades biológicas, é considerado o melhor e mais rico alimento funcional que um bebê pode receber, de forma exclusiva, do nascimento aos seis primeiros meses de vida.

Os Bancos de Leite Humano (BLH) já contabilizam três décadas de Políticas Públicas em favor do aleitamento materno no Brasil. O país é o pioneiro na construção de conhecimento e implementação de ações estratégicas integradas, o que conduz para a expressiva ampliação do aleitamento materno nas últimas décadas (Giugliani, 2004). O Brasil possui a maior e mais complexa rede de BLH do mundo, sede da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano e do Programa Ibero-americano de Bancos de Leite Humano.

A RDC 171 de 04 de setembro de 2006 da Anvisa, dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento de BLH e estabelece como características microbiológicas do Leite Humano Ordenado (LHO) pasteurizado a ausência de micro-organismos do grupo coliformes (Anvisa, 2006).

Ensaio de proficiência empregam comparações interlaboratoriais com o objetivo de avaliar a habilidade de um laboratório em realizar um determinado ensaio de modo competente. A participação nesses ensaios visa garantir a confiabilidade dos resultados produzidos e permitem uma avaliação do desempenho por monitorização contínua favorecendo a identificação de problemas relacionados com os ensaios, possibilitando a tomada de ações corretivas e/ou preventivas, para se obter a padronização das atividades (Fujimura et al, 2006).

Visando a promoção da saúde, o Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF) em conjunto com o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) promoveram o Ensaio de Proficiência em Leite Humano 1ª Rodada – Microbiologia, seguindo as diretrizes da ABNT NBR ISO/IEC 17043 (ABNT, 2011).

Assim, considerando a importância da rBLH-BR no cenário das políticas públicas de saúde e a vulnerabilidade biológica do produto fornecido pelos



BLHs, o objetivo do trabalho foi desenvolver e propor o ensaio de proficiência como ferramenta externa de controle da qualidade para avaliar de forma segura e consistente os resultados dos ensaios realizados e demonstrar a confiabilidade dos dados que a rBLH-BR produz.

## Material e Métodos

### Produção dos Itens de Ensaio (IE)

Os procedimentos de preparo dos IE e as análises foram realizados no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz, seguindo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005).

### Escolha da Matriz

Os IE foram produzidos em matriz de LHO. A utilização do leite humano, propiciou a obtenção de IE semelhantes a rotina dos BLHs, sendo desta forma mais adequados para a avaliação do ensaio realizado pela rBLH-BR.

### Preparo do Item de Ensaio

Uma cepa de *Escherichia coli* isolada a partir de uma amostra de alimento foi utilizada para o preparo do lote juntamente com uma alíquota de LHO livre de contaminação. O LHO foi homogeneizado com a suspensão de *E. coli*. Volumes de 4 mL foram distribuídos em frascos de vidro estéreis. A concentração esperada da suspensão bacteriana no leite foi de aproximadamente  $2 \times 10^3$  mL<sup>-1</sup>. Após a distribuição os frascos receberam rolhas de borracha próprias para liofilização e foram congelados em ultrafreezer a aproximadamente -70 °C por 24 horas. Posteriormente, foram submetidos a um ciclo de liofilização de 24 horas. Após a etapa de liofilização, os IE apresentaram concentrações aproximadas de  $2,0 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### Homogeneidade e Estabilidade dos IE

Foram separados aleatoriamente 33 IE do lote produzido para o teste de homogeneidade. Após a reconstituição e homogeneização do líofilo, os IE foram analisados sob condições de repetitividade.

Foram realizados estudos de estabilidade em curta duração (transporte) e em longa duração, armazenamento (-20°C) e referência (-70°C). Os testes de estabilidade foram iniciados após o preparo do lote e abrangeram o tempo disponibilizado aos laboratórios durante o EP.

A estabilidade em curta duração, verificou a influência da temperatura nas condições de transporte, foi estudada por 4 dias, em diferentes temperaturas: 4, 30 e 35 °C, utilizando o modelo Isócrono (Lamberty, Schimmel e Pauwels, 1997).

Para os estudos da homogeneidade e da estabilidade foi empregada a metodologia de ensaio sugerida por Novak e Almeida (2002). O critério utilizado foi a presença ou a ausência de coliformes totais nos IE. O lote foi considerado homogêneo ou estável quando os resultados dos ensaios qualitativos apresentaram presença de coliformes totais.



## **Envio dos IE**

O EP ocorreu em setembro de 2014. Para cada participante foram enviados dois IE contendo, cada um 4 mL de LHO liofilizado. Um dos IE continha leite humano contaminado com bactéria e o outro item continha somente leite humano.

## **Avaliação de Desempenho dos Participantes**

Os resultados reportados pelos BLH foram avaliados em relação a sua especificidade, sensibilidade e exatidão como proposto por Greenhalgh (1997). O BLH teve o seu resultado considerado “satisfatório” quando obteve o valor de exatidão de 100 %. Este valor foi calculado em função das respostas relatadas pelos BLHs aos IE enviados. Foram adotados os seguintes critérios: quando os BLHs indicaram corretamente a presença de “coliformes totais” o resultado foi considerado: “Positivo”; quando os BLHs indicaram erroneamente presença de “coliformes totais” o resultado foi considerado: “Falso Positivo”; quando os BLHs indicaram corretamente a ausência de “coliformes totais” o resultado foi considerado: “Negativo”; quando os BLHs indicaram erroneamente a ausência de “coliformes totais” o resultado foi considerado: “Falso Negativo”.

## **Resultados e Discussão**

### **Avaliação da Homogeneidade**

Todos os resultados do teste da homogeneidade foram positivos, indicando a presença de coliformes em todas as análises. Desta forma os IE foram considerados suficientemente homogêneos para a finalidade deste EP.

### **Avaliação da Estabilidade**

Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade indicaram que os IE foram estáveis a -20 °C por até 150 dias, com a possibilidade de serem transportados à temperatura inferior a 30 °C por até 3 dias.

Considerando os resultados obtidos, os IE foram enviados em caixas contendo gelo seco num prazo de até 48 horas para o recebimento dos materiais nos BLH participantes.

## **Resultados dos BLHs Participantes**

Participaram desse EP 28 centros regionais de BLH. Os dados reportados pelos participantes foram tratados de acordo com os procedimentos descritos na ABNT NBR ISO/IEC 17043 (ABNT, 2011). A tabela 1 apresenta os resultados para a análise de cada IE recebido, bem como os resultados relatados e o resultado final.

**Tabela 1: Resultados relatados pelos BLHs, resultados esperados e resultado final (Rel. = Relatado; V.D.= Valor Designado)**

Código dos Laboratórios	IE						RESULTADOS	
	#	Rel.	V.D.	#	Rel.	V.D.		
IFF 01/002	07	+	+	20	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/003	02	-	-	57	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/014	48	-	-	58	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/015	40	-	-	44	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/016	16	+	+	24	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/031	06	+	+	59	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/039	19	+	+	23	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/040	03	+	+	12	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/042	37	-	-	51	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/044	22	+	+	26	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/046	50	+	+	60	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/053	13	+	+	31	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/060	42	+	+	46	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/063	10	+	+	28	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/069	34	+	-	45	+	+	FALSO POSITIVO	POSITIVO
IFF 01/070	14	-	-	30	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/071	05	+	+	21	+	-	POSITIVO	FALSO POSITIVO
IFF 01/072	04	+	+	52	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/074	11	-	-	15	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/076	08	-	+	43	+	-	FALSO NEGATIVO	FALSO POSITIVO
IFF 01/078	35	-	-	39	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/081	33	-	-	53	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/087	27	+	+	36	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/089	01	-	-	32	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/090	18	+	+	54	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/091	38	+	+	56	-	-	POSITIVO	NEGATIVO
IFF 01/093	17	-	-	55	+	+	NEGATIVO	POSITIVO
IFF 01/094	47	+	+	49	-	-	POSITIVO	NEGATIVO

Em vermelho, resultados não-conformes.

# = número do item de ensaio

A avaliação do desempenho dos participantes, expressa através da especificidade, sensibilidade e da exatidão, está apresentada na tabela 2.

**Tabela 2: Sensibilidade (%), especificidade (%), exatidão (%) e resultado final do BLH.**

Código dos Laboratórios	Sensibilidade	Especificidade	Exatidão	Resultado
IFF 01/002	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/003	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/014	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/015	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/016	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/031	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/039	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/040	100	100	100	PROFICIENTE





IFF 01/042	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/044	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/046	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/053	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/060	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/063	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/069	N.D	50	50	NÃO PROFICIENTE
IFF 01/070	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/071	N.D	50	50	NÃO PROFICIENTE
IFF 01/072	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/074	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/076	0	0	0	NÃO PROFICIENTE
IFF 01/078	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/081	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/087	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/089	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/090	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/091	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/093	100	100	100	PROFICIENTE
IFF 01/094	100	100	100	PROFICIENTE

De acordo com os resultados obtidos, 25 participantes obtiveram resultados satisfatórios (89,3 %), sendo que três apresentaram resultados insatisfatórios (10,7 %).

Dois BLHs apresentaram resultados “falso positivo”. Se em termos analíticos este resultado é ruim, em termos de segurança alimentar pode evidenciar um certo “desperdício” da matriz “leite humano”, visto que, caso estes resultados se repitam nas análises de rotina, material não contaminado será descartado.

O BLH IFF 01/076 reportou resultados diametralmente opostos. Isto pode estar associado a erro de transcrição, visto que o mesmo conseguiu identificar um item positivo e outro negativo quanto a presença de coliformes totais.

## Conclusão

O desempenho dos BLH: pode ser considerado satisfatório, visto que somente três BLH apresentaram resultados Falso Positivo ou Falso Negativo.

Ações corretivas devem ser adotadas para os BLHs que obtiveram resultados insatisfatórios, para o aprimoramento das suas medições. Uma avaliação detalhada, de todos os passos da metodologia de análise, será importante para a identificação dos pontos críticos.

Finalmente, é importante ressaltar que o estabelecimento de ações corretivas e a contínua participação em EP desta natureza são ferramentas de grande contribuição para o aprimoramento das medições realizadas pelos BLHs.



## Referências

1. Giugliani ERJ, LamounierJA. Aleitamento Materno: uma contribuição científica para a prática do profissional de saúde. *Jornal de Pediatria* 2004; 80 (05) (supl.).
2. Agência Nacional de Vigilância sanitária (Brasil). Resolução nº 171, de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. *Diário Oficial da União*; 2006; 05 set.
3. Fujimura GL, Santana Neto SC, Licks D, Fisher M, Borba M. A busca pela excelência laboratorial: a padronização segundo a NBR ISO 17025:2005. In: *Anais do Encontro de Engenharia de Produção e Sistemas da Faculdade de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina*; 2006; Santa Catarina.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISO/IEC 17043. "Avaliação de Conformidade — Requisitos Gerais para Ensaios de Proficiência." Rio de Janeiro: ABNT; 2011.
5. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISO/IEC 17025. "Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração." Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
6. Lamberty A.; Schimmel H.; Pauwels J. "The Study of the Stability of Reference Materials by Isochronous Measurements" *Fresenius J. Anal. Chemistry*. 1997. 359-61.
7. Novak FR, Almeida JAG. Teste alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. *J. Pediatr.* [online]. 2002. 78 (3): 193-6.
8. GREENHALGH T. How to Read a Paper - Papers that Reports Diagnostic or Screening Tests. *BMJ*. 1997. 315: 540 -3.