

Sara Inês da Cunha Correia

**IMPLEMENTAÇÃO DE UMA FERRAMENTA
INFORMÁTICA PARA CONTROLO DA QUALIDADE
DE MEIOS DE CULTURA MICROBIOLÓGICOS DE
ACORDO COM A ISO 11133:2014**

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar



Março, 2020

Sara Inês da Cunha Correia

**IMPLEMENTAÇÃO DE UMA FERRAMENTA INFORMÁTICA
PARA CONTROLO DA QUALIDADE DE MEIOS DE
CULTURA MICROBIOLÓGICOS DE ACORDO COM A ISO
11133:2014.**

Dissertação

Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Raquel Guiné

Trabalho co-orientado por
Professor António Pinto

Março, 2020



***“As doutrinas expressas neste trabalho são da exclusiva
responsabilidade do autor.”***

A aluna está obrigada a respeitar o termo de confidencialidade da empresa onde realizou o projeto.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e estímulo de diversas pessoas e respetivas instituições, aos quais desde já agradeço e que passo a enumerar:

À ESAV, por todos os meios disponíveis e por todas as aprendizagens transmitidas durante estes anos.

Aos meus orientadores, à professora Doutora Raquel Guiné, ao professor co-orientador Engenheiro António Pinto e à Engenheira Elisa Maia, gostaria de agradecer todo o apoio, orientação, disponibilidade e paciência, auxiliando – me sempre que possível.

O meu próximo agradecimento é dirigido a toda a equipa do laboratório de Microbiologia da ALS Controlvet, por terem sido compreensivos e por terem sempre uma palavra de apoio e de encorajamento.

E por fim, um agradecimento à minha família, principalmente aos meus pais, que me transmitiram os seus ensinamentos e contribuíram para a pessoa que sou hoje. Obrigada pelo apoio incondicional e pelas palavras de motivação.

A formação académica, profissional e individual é conseguida pela partilha de experiências, conhecimento, apoio, dedicação, gratidão e disponibilidade, portanto, quero agradecer a todos aqueles que fizeram parte do meu percurso até aqui e que contribuíram para o meu crescimento.

A todos um muito obrigada!

RESUMO

A segurança alimentar, representa uma das principais preocupações com que as autoridades, os agentes económicos e os consumidores se confrontam atualmente. O controlo da qualidade microbiológica é, não apenas, uma obrigatoriedade legal, mas também uma prática comum e necessária no âmbito do correto funcionamento dos sistemas de gestão da segurança alimentar implementados pelas empresas dedicadas à área alimentar.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do curso de Mestrado de Qualidade e Tecnologia Alimentar em colaboração com a ALS Controlvet, Laboratório de microbiologia, e teve como principal objetivo melhorar um *software* preexistente para uma nova funcionalidade, nomeadamente, a gestão do controlo da qualidade dos meios de cultura, tornando assim todo o processo mais eficaz. A importância do desenvolvimento de uma “nova ferramenta” no âmbito da empresa advém do facto de se tratar de um laboratório de ensaios acreditados pelo Instituto Português de Acreditação, de acordo com norma NP EN ISO 17025.

A norma NP EN ISO 17025 intitulada de “Requisitos gerais de competências para laboratórios de ensaios e calibração” é uma das normas aplicadas a Laboratórios de ensaios e calibração, e nela são abordados os mais variados assuntos e pontos de importante interesse em serem controlados num laboratório, como por exemplo questões ligadas à organização, controlo de documentos, instalações, equipamentos ou os métodos de ensaio e calibração e respetiva validação. Dentro de todo o processo efetuado em Laboratórios acreditados, o controlo dos meios de cultura é um ponto importante a ter em atenção em Laboratórios de microbiologia, na medida em que os meios de cultura são a base do trabalho. Daí a ISO 11133:2014 ser uma norma exclusiva para o controlo dos meios de cultura.

Esta norma aborda alguns assuntos como a preparação, documentação e armazenamento dos meios de cultura, seleção dos microrganismos para os testes, realização dos testes de desempenho e os respetivos critérios de aceitação.

Ao longo da dissertação é explicada a forma como foi desenvolvido o trabalho de melhoria de uma ferramenta informática do controlo da qualidade. Este *software*

após os desenvolvimentos e melhorias introduzidas, permitirá a automatização de todo o processo analítico do controlo da qualidade dos meios de cultura.

A implementação deste sistema traduz-se num processo mais rápido e num aumento da eficiência. Para a ALS Controlvet este projeto vai favorecer a organização ao nível de planeamento, ordem de trabalho, gestão de tempo, uma vez que todos os registos primários do processo serão em software e é a garantia de toda a rastreabilidade do controlo da qualidade dos meios de cultura.

A implementação deste sistema dá-nos a garantia da confiabilidade dos resultados e procedimentos do laboratório de microbiologia, bem como a automatização do procedimento de análise de certificados dos meios de cultura.

PALAVRAS – CHAVE: Controlo da Qualidade, Meios de cultura, ISO 11133:214, Software.

ABSTRACT

Food security represents one of the main concerns facing authorities, economic agents and consumers today. The control of microbiological quality is not only a legal requirement, but also a common and necessary practice in the context of the correct functioning of the food safety management systems implemented by companies dedicated to the food area.

The project work gave rise to this dissertation was developed within the scope of the Master's Degree in Food Quality and Technology, in collaboration with ALS Controlvet, a microbiology laboratory, and its main objective was to improve existing software for a new functionality, namely, the management of quality control of culture media, thus making the whole process more effective. The importance of developing a "new tool" within the company comes from the fact that it is a testing laboratory accredited by the Portuguese Institute of Accreditation, in accordance with standard NP EN ISO 17025.

The standard NP EN ISO 17025 entitled "General competence requirements for testing and calibration laboratories" is one of the standards applied to testing and calibration laboratories, and it addresses the most varied subjects and points of important interest in being controlled in a laboratory, such as issues related to the organization, control of documents, installations, equipment or the methods of testing and calibration and respective validation. Within the whole process carried out in accredited laboratories, the control of the culture media is an important point to be controlled in microbiology laboratories, insofar as, the culture media are the basis of the work. Hence ISO 11133: 2014 is an exclusive standard for the control of culture media.

This standard addresses some issues such as the preparation, documentation and storage of culture media, selection of microorganisms for testing, performance of performance tests and the respective acceptance criteria.

Throughout the dissertation, it is explained how the work to improve a computerized quality control tool was developed. This software, after the developments and improvements introduced, will allow the automation of the entire analytical process of quality control of culture media.

The implementation of this system translates into a faster process and an increase in efficiency. For ALS Controlvet this project will favor the organization at the

level of planning, work order, time management, since all primary records of the process will be in software and is the guarantee of all traceability of the quality control of the media culture.

The implementation of this system gives us the assurance of the reliability of the results and procedures of the microbiology laboratory, as well as the automation of the procedure of analysis of certificates of the culture media.

Keywords: Quality Control, Culture Media, ISO 11133:2014, Software.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| AGRADECIMENTOS | iv |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vii |
| ÍNDICE | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| ÍNDICE DE TABELAS | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xv |
| I.INTRODUÇÃO | 1 |
| II.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1.Normalização | 4 |
| 1.1.Organismos de normalização..... | 4 |
| 1.2.Conceito de norma | 5 |
| 2.A acreditação de ensaios segundo a NP EN ISO IEC 17025:2005 | 5 |
| 2.1.Aplicação da ISO 17025:2005 num laboratório de microbiologia | 6 |
| 3.ISO 11133:2014 - microbiology of food, animal feed and water – preparation, production, storage and performance testing of culture media | 8 |
| 3.1.Gestão da garantia da qualidade | 8 |
| 3.2.Teste de desempenho dos microrganismos..... | 9 |
| 3.3.Controlo da qualidade e testes de desempenho dos meios de cultura | 10 |
| 3.4.Procedimentos dos testes de desempenho | 10 |
| 4.Ferramentas do controlo da qualidade | 12 |
| 4.1.Ensaio em branco | 13 |
| 4.2.Ensaios em paralelo e sementeira em duplicado..... | 13 |
| 4.3.Contagens em duplicado..... | 14 |
| 4.4.Controlo com material de referência | 14 |
| 4.5.Controlo dos meios de cultura após preparação..... | 15 |
| 4.6.Controlo de esterilidade | 15 |
| 4.7.Cartas de produtividade | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 4.8.Amostras cegas | 16 |
| 4.9.Ensaio interlaboratoriais | 16 |
| III.MATERIAL E MÉTODOS | 19 |
| 1.A unidade de microbiologia aplicada | 19 |
| 2.Preparação de meios de cultura | 20 |
| 2.1. Conservação dos meios de cultura, diluentes e/soluções..... | 21 |
| 3.Manutenção de culturas de referência | 21 |
| 3.1.Preparação de culturas de stock de referência | 22 |
| 3.2.Preparação de culturas de stock..... | 22 |
| 3.3.Preparação de culturas de trabalho | 23 |
| 3.4.Preparação de suspensões para teste..... | 24 |
| 4. Controlo da qualidade dos meios de cultura | 25 |
| 4.1.Testes de desempenho dos meios sólidos | 25 |
| 4.1.1. Produtividade..... | 26 |
| 4.1.2. Seletividade | 28 |
| 4.1.3. Especificidade..... | 28 |
| 4.2.Testes de desempenho dos meios que utilizam membranas filtrantes | 29 |
| 4.3.Testes de desempenho dos meios líquidos | 30 |
| 4.3.1.Meios de enriquecimento seletivo..... | 30 |
| 4.3.2.Meios de enriquecimento não seletivos | 32 |
| 4.4.Testes de desempenho dos diluentes..... | 33 |
| IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 1.Controlo de qualidade ao meio Tryptone Bile X-glucuronide agar..... | 34 |
| 1.1.Produtividade | 36 |
| 1.2.Seletividade..... | 37 |
| 1.3. Especificidade | 37 |
| 2.Procedimentos da implementação da ferramenta informática | 38 |
| 2.1.Template | 39 |
| 2.2.Ensaio | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.Métodos | 41 |
| 2.3.1.Métodos do Controlo da Qualidade qualitativo da produtividade | 42 |
| 2.3.2.Métodos do Controlo da Qualidade quantitativo da produtividade | 45 |
| 2.3.3.Métodos do Controlo da Qualidade da seletividade..... | 49 |
| 2.3.4.Métodos do Controlo da Qualidade da especificidade..... | 51 |
| 2.3.5.Métodos do Controlo da Qualidade da esterilidade | 53 |
| 3.A ferramenta informática | 55 |
| V.CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 64 |
| VI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| VII.ANEXOS..... | 69 |
| ANEXO A- Critérios dos testes de desempenho dos meios de cultura | 69 |
| ANEXO A (continuação) | 70 |
| ANEXO A (continuação) | 71 |
| ANEXO B –Técnica do meio Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX) | 72 |
| ANEXO C -Certificado de Avaliação Interna da Qualidade dos meios de cultura . | 73 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1- LOGÓTIPO DO LABORATÓRIO, ALS CONTROLVET. | 19 |
| FIGURA 2- ESQUEMATIZAÇÃO DO MÉTODO QUANTITATIVO PARA AVALIAR A PRODUTIVIDADE DOS MEIOS QUE UTILIZAM MEMBRANAS FILTRANTES | 29 |
| FIGURA 3- ESQUEMATIZAÇÃO DO MÉTODO QUALITATIVO PARA AVALIAR O DESEMPENHO DE MEIOS LÍQUIDOS SELETIVOS | 31 |
| FIGURA 4- ESQUEMATIZAÇÃO DO MÉTODO QUALITATIVO PARA AVALIAR O DESEMPENHO DE MEIOS LÍQUIDOS NÃO SELETIVOS DE ENRIQUECIMENTO | 32 |
| FIGURA 5- PLACA DE CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI B-GLUCURONIDASE</i> POSITIVA EM MEIO TBX..... | 35 |
| FIGURA 6- LOGÓTIPO DA APLICAÇÃO LAB, DA ALS CONTROLVET. | 38 |
| FIGURA 7- MODELO DO TEMPLATE UTILIZADO NO LABORATÓRIO QUE PERMITE FAZER A RASTREABILIDADE DO PROCESSO ANALÍTICO DO CQ. | 39 |
| FIGURA 8- ENSAIOS DO CQ DOS MEIOS DE CULTURA, EXTRAÍDOS NA APLICAÇÃO “LAB”. | 40 |
| FIGURA 9- EXEMPLO DO REGISTO DE UM NOVO ENSAIO DO CQ DOS MEIOS DE CULTURA- DADOS GERAIS. | 41 |
| FIGURA 10 - EXEMPLO DAS TAREFAS CONFIGURADAS AO MÉTODO | 42 |
| FIGURA 11- EXEMPLO DO PARÂMETRO CARREGADOS PARA UM ENSAIO DO CQ. | 43 |
| FIGURA 12- EXEMPLO DA CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO UTILIZADO NO ENSAIO DO CQ. . | 44 |
| FIGURA 13- EXEMPLO DO PARÂMETRO DA LEITURA CARREGADO NO ENSAIO DO CQ QUALITATIVO DE PRODUTIVIDADE..... | 45 |
| FIGURA 14- EXEMPLO DO REGISTO DE UM ENSAIO DO CQ QUANTITATIVO DE PRODUTIVIDADE DO TBX..... | 46 |
| FIGURA 15- EXEMPLO DE PARÂMETROS CARREGADOS PARA UM CQ QUANTITATIVO | 46 |
| FIGURA 16- EXEMPLO DA CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO E DO MEIO DE REFERÊNCIA UTILIZADO NO ENSAIO DO CQ QUANTITATIVO. | 47 |
| FIGURA 17- EXEMPLO DO PARÂMETRO DA LEITURA PARA UM CQ QUANTITATIVO DE PRODUTIVIDADE..... | 48 |
| FIGURA 18- EXEMPLO DAS FÓRMULAS CARREGADAS PARA O CALCULO AUTOMÁTICO DO CQ QUANTITATIVO DE PRODUTIVIDADE. | 48 |
| FIGURA 19- EXEMPLO DO REGISTO DE UM ENSAIO DO CQ DE SELETIVIDADE DO TBX. | 49 |
| FIGURA 20- EXEMPLO DE PARÂMETROS CARREGADOS PARA UM CQ DE SELETIVIDADE. | 50 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 21 – EXEMPLO DO MR CARREGADO (CIMA) E RESPETIVA LEITURA DO CQ DE SELETIVIDADE DO MEIO DE CULTURA (BAIXO). | 51 |
| FIGURA 22 - EXEMPLO DO REGISTO DE UM ENSAIO DO CQ DE ESPECIFICIDADE DO TBX..... | 51 |
| FIGURA 23 - EXEMPLO DO MR CARREGADO NO CQ DE ESPECIFICIDADE DO MEIO DE CULTURA. | 52 |
| FIGURA 24 - EXEMPLO DO PARÂMETRO DA LEITURA CARREGADO NO MÉTODO DO CQ DA ESPECIFICIDADE. | 52 |
| FIGURA 25 - EXEMPLO DE UM ENSAIO DE ESTERILIDADE PARA OS MEIOS DE CULTURA..... | 53 |
| FIGURA 26 - EXEMPLO DO PARÂMETRO DA LEITURA CARREGADO PARA UM MÉTODO DE CQ E ESTERILIDADE..... | 54 |
| FIGURA 27 - EXEMPLO DO TEMPLATE ORGANIZADO E COMPLETO. | 55 |
| FIGURA 28 - PARTE DA APLICAÇÃO “LAB”, ONDE O CQ JÁ ESTÁ GERADO E CARREGADO. | 56 |
| FIGURA 29 - PARÂMETRO DO MR UTILIZADO CARREGADO AUTOMATICAMENTE..... | 56 |
| FIGURA 30 - PARÂMETROS DA LEITURA CARREGADOS AUTOMATICAMENTE. | 57 |
| FIGURA 31 - PARÂMETROS CARREGADOS AUTOMATICAMENTE PARA ENSAIO DA CQ DE SELETIVIDADE..... | 58 |
| FIGURA 32 - PARÂMETROS CARREGADOS AUTOMATICAMENTE PARA ENSAIO DE CQ DE ESPECIFICIDADE. | 59 |
| FIGURA 33 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MEIO TBX..... | 60 |
| FIGURA 34 - EXEMPLO DA CONFIGURAÇÃO DO SOFTWARE PARA UM CQ QUANTITATIVO. | 61 |
| FIGURA 35 -EXEMPLO DO RESULTADO DE PRODUTIVIDADE PARA UMA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA. | 62 |
| FIGURA 36 - ANÁLISES DO CONTROLO DE QUALIDADE DO MEIO TBX..... | 63 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| TABELA 1- CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO MEIO DE CULTURA TBX. | 36 |
|--|-----------|

LISTA DE ABREVIATURAS

IPQ – Instituto Português da Qualidade

BHI – Brain Heart Infusion Broth

ISO – Organização Internacional para Normalização (International Organization for Standardization);

CQ – Controlo de qualidade

UFC – Unidades formadoras de colónias;

IEC – International Electrotechnical Organization

TS – Tryptone Salt Broth

TSA – Tryptone Soya Agar

TBX –Tryptone Bile X-Glucuronide agar

CT – Comissões Técnicas

IPAC – Instituto Português da Acreditação

EA – European Cooperation for Accreditation

PR – Porção de Produtividade

SF – Fator de Seletividade

WDCM –World Date Centre of Microorganism

MR – Material de Referência

.

I. INTRODUÇÃO

A produção aliada à qualidade é uma das competências que as empresas tendem a desenvolver e melhorar, no seu quotidiano, para que possam competir no mundo atual. A melhor forma de o fazer é investir tempo na prossecução da qualidade. Nesse contexto, um dos parâmetros de primordial importância é abordar os instrumentos analíticos utilizados. Com efeito, estes devem ser verificados e aperfeiçoados, mesmo que já sejam eficazes e cumpram com as especificações ou, quando tal não acontece, deverão ser modificados, com o objetivo de incentivar uma procura de melhoria constante. Só este procedimento assegura resultados cada vez melhores, com consequências cada vez mais satisfatórias na prossecução da qualidade (António et al., 2016).

Este trabalho foi elaborado no âmbito empresarial, desenvolvido na empresa ALS Controlvet. Esta empresa está integrada numa rede mundial de Laboratórios de análises físicas, químicas e biológicas. Seguindo a política geral implementada, a ALS Controlvet tem como objetivo constante implementar, desenvolver e inovar serviços, produtos, novos métodos de trabalho, novas ferramentas úteis, não só para ir de encontro às necessidades/solicitações dos clientes, mas também para aumentar a produtividade, naturalmente, numa perspetiva de qualidade total. O Laboratório onde foi desenvolvido o trabalho foi, mais concretamente, o Laboratório de análises microbiológicas. A ALS Controlvet é um laboratório de ensaios acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), de acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025.

O controlo da qualidade dos resultados no Laboratório, envolve todos os aspetos da qualidade analítica, desde a amostragem (seleção e manuseamento de amostras), metodologias, ambiente, equipamento, meios de cultura e reagentes, pessoal, controlo de qualidade interna e externa.

O controlo da qualidade dos meios de cultura de um Laboratório visa a obtenção da conformidade dos resultados obtidos durante as análises microbiológicas. O objetivo do controlo da qualidade de meios de cultura é, garantir a confiança de que os microrganismos-alvo serão sempre recuperados com uma determinada sensibilidade (Lightfoot & Maier, 2003).

A implementação de um sistema de controlo da qualidade, permite garantir a qualidade no Laboratório, reduzindo os erros de execução de análises, aumento da confiança e credibilidade do Laboratório.

Inserida na Empresa e no sentido de desenvolver esta política de melhoria contínua, desenvolvi o presente trabalho com o objetivo principal de rever e melhorar o controlo de qualidade dos meios de cultura produzidos do Laboratório de análises microbiológicas da ALS Controlvet. Para prossecução desse objetivo, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Execução dos diferentes controlos da qualidade dos meios utilizados no laboratório de microbiologia;
- Garantir da confiabilidade dos resultados e procedimentos do laboratório de microbiologia;
- Registo e monitorização do controlo da qualidade;
- Implementação da ferramenta informática para o controlo da qualidade dos meios de cultura.
- Automatização do procedimento de análise de certificados dos meios de cultura.

O projeto desenvolvido teve como resultado a presente dissertação que está organizada em 7 capítulos:

- O presente capítulo serve para descrever os intervenientes do projeto, os motivos que deram origem à sua elaboração, os objetivos propostos e a organização dos conteúdos;
- O segundo capítulo inclui um enquadramento do tema, através de uma revisão bibliográfica, permitindo esclarecer e clarificar conceitos relevantes sobre o Controlo da qualidade;
- O terceiro capítulo diz respeito à metodologia aplicada ao trabalho que foi desenvolvido na ALS Controlvet;
- O quarto capítulo refere o trabalho que foi desenvolvido e aos resultados concretizados na ALS Controlvet;
- As apreciações e reflexões sobre a atividade desenvolvida surgem no quinto capítulo. Neste capítulo também serão sugeridas perspetivas futuras para uma contínua evolução e melhoria do projeto;

- Em sexto lugar surgem as referências bibliográficas que serviram de suporte para a concretização desta dissertação;
- Para um melhor esclarecimento e como complemento sobre alguns assuntos descritos no corpo do trabalho, foi incluído um sétimo capítulo, com um conjunto de anexos, disponíveis para consulta.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Normalização

Normalização é um termo que é definido como “a atividade destinada a estabelecer, face a problemas reais ou potenciais, disposições para a utilização comum e repetida, tendo em vista a obtenção do grau ótimo de ordem, num determinado contexto” (IPQ, 2015).

1.1. Organismos de normalização

A nível internacional, a ISO (*International Organization for Standardization*) e a IEC (*International Electrotechnical Organization*) são os dois principais organismos de normalização, sendo que todas as normas internacionais são controladas pela organização mundial do comércio (Vargas, 2006). De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO, 2017), a ISO teve origem no ano de 1946 quando um grupo de representantes de 25 países decidiram criar uma organização com o intuito de “facilitar a coordenação e uniformização das normas industriais a nível internacional” (ISO, 2017).

Esta é uma organização não-governamental, independente que engloba 162 organismos de normalização. Relativamente à IEC, é uma organização internacional fundada em 1906 e tem como principal objetivo a normalização de todas as tecnologias elétricas, eletrónicas e outras (IEC, 2017). Assim, toda a normalização relacionada com outras atividades, exceto as elétricas e eletrónicas, estão ao encargo da ISO. A nível nacional, o organismo responsável pela normalização em Portugal, é o IPQ (Instituto Português da Qualidade), que representa o nosso país na ISO desde 1949, na IEC desde 1929, a nível internacional.

Desta forma, a função do IPQ consiste em gerir de forma eficaz o nosso processo normativo, isto é, manter o nosso país atualizado a nível das novas normas desenvolvidas internacionalmente, promover elaborar as normas

portuguesas, representar o nosso país nas entidades europeias e mundiais (IPQ, 2017).

1.2. Conceito de norma

Segundo o IPQ (2015), as normas são os “documentos resultantes de um consenso, aprovados por um organismo de normalização reconhecido, que estabelecem regras, guias ou características de produtos ou serviços, assentes em resultados consolidados, científicos, técnicos ou experimentais”. Assim, as normas são os documentos oficiais que contém as regras que devem ser cumpridas caso se pretenda ser acreditado pelas mesmas, sendo estes documentos de aderência voluntária.

2. A acreditação de ensaios segundo a NP EN ISO IEC 17025:2005

De acordo com Lightfoot & Maier (1998), todos os laboratórios que realizam ensaios microbiológicos em apoio ao cumprimento da regulamentação deveriam ser acreditados pelo organismo de acreditação apropriado. A implementação de um programa de garantia da qualidade dará confiança na validade dos resultados produzidos.

A acreditação é o procedimento pelo qual um organismo autorizado reconhece formalmente que uma entidade é competente para realizar determinadas atividades específicas, evidenciando-o através de um certificado que descreve o âmbito da acreditação. Este procedimento é também uma forma de estabelecer uma rede de reconhecimento de competências, no sentido em que um amplo conjunto de clientes reconhece a competência do organismo avaliador e por sua vez este reconhece a competência dos laboratórios (Almeida e Pires, 2006).

Em Portugal, o organismo responsável pela acreditação é o Instituto Português de Acreditação (IPAC). No processo de acreditação, o IPAC é responsável pela avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade. Esta atividade, está sujeita à

legislação comunitária que obriga um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação.

Para Almeida e Pires (2006), a acreditação surge como o mecanismo avaliador que só deve ser acionado quando o sistema da qualidade estiver implementado e a funcionar sem grande resistência. O processo de acreditação é de extrema importância para o laboratório, pois este serve para ganhar e transmitir confiança na execução de atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnico reconhecido internacionalmente.

A norma NP EN ISO/IEC 17025, abrange os ensaios e as calibrações realizadas segundo métodos normalizados, métodos não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório. Esta norma, é aplicável a todos os laboratórios que efetuarem ensaios e /ou calibrações, independentemente do número de pessoas ou da extensão do âmbito das suas atividades e ainda laboratórios nos quais os ensaios e/ou calibrações façam parte integrante da inspeção e da certificação de produtos.

A acreditação é vantajosa, na medida em que o laboratório passa a ter a capacidade de evidenciar o nível da qualidade com que trabalha. A importância da acreditação traduz-se na confiança que o laboratório transmite ao mercado, pois o facto de um laboratório estar acreditado significa que está organizado segundo princípios, práticas de gestão e técnicas adequadas. A um outro nível, a acreditação é um facilitador do comércio internacional uma vez que o resultado analítico emitido por um laboratório acreditado é válido noutro país que adote o mesmo sistema da qualidade e que seja signatário dos Acordos de Reconhecimento Mútuo (Almeida & Pires 2006).

2.1. Aplicação da ISO 17025:2005 num laboratório de microbiologia

Como a qualidade para a prestação de serviços é tão importante como a dos processos de produção de produtos, a acreditação de um laboratório vai transmitir a qualidade com que o seu serviço é prestado, aumentando assim a confiança do consumidor para a procura e obtenção do seu serviço (Machado e Almeida, 2013). Dentro da acreditação das várias entidades, a acreditação dos laboratórios segue a norma ISO 17025 que é intitulada de “Requisitos Gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração” (IPAC, 2017). Como já foi referido anteriormente, um laboratório para ser acreditado tem que cumprir os requisitos que constituem esta

norma, pelo que será alvo de auditorias de forma a ser verificado se esses mesmos requisitos são cumpridos verdadeiramente. Dentro dos laboratórios existe uma vasta gama de normas pelas quais eles podem ser acreditados, como por exemplo os métodos que utilizam, sendo que são específicas para a área do laboratório, isto é, são diferentes para laboratórios de microbiologia e para laboratório de química, física, físico-química, biologia, geologia, entre outras áreas.

Relativamente à aplicação da ISO 17025:2005 num laboratório de microbiologia, há alguns aspetos que são necessários ter em atenção e que são mais específicos para este tipo de laboratórios em diferentes níveis. No nível dos recursos humanos, os analistas que realizam as análises microbiológicas devem ser qualificados na área de microbiologia e devem receber treino e formação adequados à função que desempenham. No nível do ambiente, no caso de um laboratório de microbiologia, este parâmetro é importante para se evitar a ocorrência de contaminações cruzadas, sendo aplicação do princípio da “marcha em frente”, onde no interior do laboratório, tudo percorre o mesmo caminho, com a mesma entrada e a mesma saída. No nível da incerteza da medição, em testes microbiológicos, a incerteza é estimada através da repetibilidade e reprodutibilidade dos testes. Ao nível do equipamento utilizado, deve-se sempre prevenir a ocorrência de contaminações cruzadas, como por exemplo através da utilização de equipamento descartável ou de vidro reutilizável devidamente limpos e estéreis. Ao nível dos reagentes e dos meios de cultura utilizados, a sua qualidade deve ser garantida pelo laboratório, bem como ao nível dos materiais e culturas de referência, onde deve ser seguida a ISO 11133:2014. Ao nível da amostragem também há normas pelas quais os laboratórios podem ser acreditados, de forma a garantir a qualidade do seu processo. Ao nível da garantia da qualidade dos resultados obtidos e do desempenho do laboratório, é importante que haja um controlo de qualidade interno que controle todos os procedimentos efetuados no laboratório e um controlo da qualidade externo para avaliar todo o funcionamento do laboratório (RELACRE, 2007). Neste caso, ao aplicar esta norma para um laboratório de microbiologia, entre outros aspetos que são necessários de controlar, a qualidade dos meios de cultura é um aspeto que é importante validar, sendo por isso, este assunto realçado.

Desta forma, para se realizar o controlo da qualidade dos meios de cultura num laboratório existe uma norma da ISO que refere e explicita todo o controlo necessário de ser efectuado no laboratório, a ISO 11133:2014 intitulada “Microbiology of food,

animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media” (Gerten, 2014).

3. ISO 11133:2014 - microbiology of food, animal feed and water – preparation, production, storage and performance testing of culture media

A ISO 11133:2014, é uma norma que deve ser implementada por todos os laboratórios de microbiologia no âmbito do controlo da qualidade dos meios de cultura (Gerten, 2014).

A norma está dividida em 10 capítulos, onde estão explícitas instruções detalhadas sobre o controlo da qualidade dos meios de cultura no laboratório, entre os quais os capítulos 1-3 que abordam aspetos gerais da norma, termos e definições, o capítulo 4 que aborda a gestão da garantia de qualidade; o capítulo 5 sobre os testes de desempenho dos microrganismos teste, o capítulo 6 sobre o controlo da qualidade dos testes de desempenho dos meios de cultura e os capítulos 7, 8 e 9 sobre os testes de desempenho. A utilização destes testes de desempenho é importante na medida em que vão garantir a qualidade dos meios de cultura ao nível da produção, armazenamento, se os resultados obtidos nos testes estiverem dentro das especificações que são específicas para cada meio de cultura e estão presentes nos anexos E e F da ISO 11133:2014 (Sampaio, 2006).

3.1. Gestão da garantia da qualidade

A ISO aborda aspetos relacionados com alguns aspetos diretamente ligados à elaboração dos meios de cultura, como por exemplo sobre documentação, a preparação laboratorial dos meios de cultura, o armazenamento dos mesmos e a preparação para a sua utilização. Segundo a ISO 11133:2014, a documentação é um ponto importante para a garantia de qualidade uma vez que, os documentos vão garantir que os produtos que foram adquiridos pelo laboratório sejam de qualidade.

No que diz respeito à preparação laboratorial dos meios de cultura, a norma refere alguns aspetos que são necessários ter em atenção, como as condições da água que é utilizada, principalmente para a re-hidratação dos meios de cultura desidratados,

a forma como se pesa, re-hidrata e dissolve o meio de cultura, como se procede para a medição e o respetivo ajuste do pH, se necessário, alguns aspetos relacionados com a esterilização, quer por calor-húmido (autoclave), quer por filtração e alguns cuidados a ter com os suplementos e a sua preparação. Relativamente à validade e ao armazenamento dos meios de cultura que são preparados no laboratório, a norma refere a importância da sua identificação para fins de rastreabilidade, avaliação e controlo dos prazos de validade nos meios já preparados, estando eles ou não em caixas de Petri prontos a utilizar (ISO 11133:2014).

A norma ISO 11133:2014 também refere alguns aspetos relativos à preparação dos meios de cultura para a sua utilização, como o processo de fusão de meio de cultura de Agar, a remoção do ar do meio de cultura, a adição dos suplementos, a distribuição dos meios e a sua preparação para a incubação e algumas chamadas de atenção para a incubação dos meios sólidos.

3.2. Teste de desempenho dos microrganismos

Neste capítulo a norma aborda os aspetos relacionados com os microrganismos e a sua preparação para a realização dos testes de desempenho. A seleção dos microrganismos teste deve ser realizada individualmente para cada meio de cultura e para cada teste, como está descrito nos anexos E e F da ISO 11133:2014 e estes devem ser representativos das suas espécies e demonstrar um desempenho óptimo num meio específico.

Quanto à origem dos microrganismos, o laboratório pode adquiri-los comercialmente ou podem ser estirpes isoladas pelo laboratório. Destes, são preparados stocks de referência que são armazenados no laboratório a baixas temperaturas ou liofilizados, que por sua vez dão origem a culturas stock. Posteriormente, das culturas stock, vão ser preparadas as culturas de trabalho, que vão dar origem às suspensões teste através da preparação de diluições decimais sucessivas. Neste capítulo a norma também refere as quantidades de inóculo que são necessárias para cada um dos testes (ISO 11133:2014).

3.3. Controlo da qualidade e testes de desempenho dos meios de cultura

Na norma são abordados aspetos que são controlados nos meios de cultura, quer ao nível físico e químico, quer ao nível microbiológico. Relativamente ao controlo da qualidade físico e químico dos meios, a norma refere que deve ser controlado o volume do meio nas placas, a aparência, cor e homogeneidade, consistência do gel, o teor de humidade o pH, suplementos, entre outros. Por outro lado, ao nível do controlo da qualidade microbiológico, o meio de referência utilizado deve ser consistente e de alta qualidade e os microrganismos utilizados para os testes são específicos para cada meio de cultura. Mais concretamente sobre a realização dos testes de desempenho microbiano, dependendo da especificidade do meio, a norma refere a realização de testes qualitativos ou quantitativos.

Também são diferenciados os meio “prontos a usar” dos que são preparados a partir de formulações desidratadas, uma vez que os “prontos a usar” já tiveram de ser submetidos a esses testes por parte dos fabricantes (ISO 11133:2014).

3.4. Procedimentos dos testes de desempenho

Nos capítulos 7, 8 e 9, a norma aborda os procedimentos para cada um dos testes de desempenho, sendo respetivamente os meios de cultura sólidos, meios de cultura líquidos e diluentes e meios de cultura de transporte.

No que diz respeito aos testes quantitativos, pode ser avaliada a produtividade e a seletividade dos meios através de dois parâmetros que podem ser calculados, P_R é a de produtividade e S_f que é o fator de seletividade. O P_R é razão entre o número total de colónias no meio teste (N_s) e o número total de colónias obtidas num meio de referência (N_0), como se pode verificar na equação 1. O S_f consiste na diferença entre o valor da maior diluição em que se verificou crescimento num meio não seletivo de referência (D_0) e o valor da maior diluição em que o crescimento é comparável no meio em estudo (D_s), como se pode verificar na equação 2.

Relativamente aos testes qualitativos, pode ser avaliada a produtividade, seletividade e especificidade dos meios através da presença ou ausência de crescimento nas placas (ISO 11133:2014).

$$\text{Pr (\%)} = \frac{N_s}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

$$S_f = D_0 - D_s \quad (2)$$

4. Ferramentas do controlo da qualidade

O Controlo da qualidade (CQ) num laboratório visa a obtenção da conformidade dos resultados obtidos durante as análises microbiológicas. A implementação de um sistema de CQ, permite garantir a qualidade no laboratório, reduzindo os erros de execução de análises, aumento da confiança e credibilidade do laboratório.

O CQ dos resultados no laboratório, envolve todos os aspetos da qualidade analítica, desde a amostragem (seleção e manuseamento de amostras), metodologias, ambiente, equipamento, meios de cultura e reagentes, pessoal, controlo da qualidade interna e externa.

O laboratório de microbiologia, adotou o uso das seguintes ferramentas de CQ:

- Ensaio em branco;
- Réplicas ou sementeira em duplicado;
- Ensaio em paralelo;
- Contagens em duplicado;
- Controlo com material de referência;
- Controlos dos meios de cultura;
- Controlo de esterilidade;
- Cartas de produtividade;
- Amostras cegas;
- Ensaio interlaboratoriais;

O controlo da qualidade analítico compreende 3 linhas de orientação:

1. A 1ª linha compreende um conjunto de procedimentos usados pelo operador para uma autoavaliação.
2. A 2ª linha inclui um conjunto de procedimentos observados periodicamente por uma pessoa diferente do operador.
3. A 3ª linha baseia-se em comparações com o exterior, o que permite uma avaliação do desempenho do laboratório.

4.1. Ensaio em branco

O ensaio em branco tem como principal objetivo testar as condições de esterilidade durante todo o processo analítico, no que se refere à esterilidade do meio de cultura, do diluente e a eficácia do operador. Esta ferramenta, representa o CQ da 1ª linha.

A cada ensaio efetuado pelo laboratório deve ser realizado um ensaio em branco. Este ensaio é constituído por uma amostra feita a partir do diluente ou água estéril conforme aplicável, sobre o qual se realizam as filtrações, diluições, inoculações e incubações como se de uma amostra normal se tratasse.

A realização de ensaios em branco é inserida no sistema informático, que lhe atribui automaticamente um número de análise. Os resultados das leituras deverão ser isentos de unidades formadoras de colónias (UFC).

4.2. Ensaios em paralelo e sementeira em duplicado

Para assegurar a precisão intermédia dos resultados obtidos nas análises realizadas pelo mesmo analítico ou entre analíticos, está implementado um programa de realização de ensaios em duplicado e em paralelo.

Define-se como ensaios duplicados aqueles em que os volumes da suspensão são iguais, da mesma amostra, são diluídos, inoculados e incubados nas mesmas condições, e pelo mesmo analista.

São definidos como ensaios paralelos aqueles em que os volumes da suspensão são iguais, da mesma amostra, são diluídos, inoculados e incubados, mas por analistas diferentes (ISO 19036:2006).

Mensalmente são efetuados ensaios a partir de uma amostra artificial ou naturalmente contaminada, em que a mesma amostra é analisada em duplicado e em paralelo em todas as fases do ensaio.

Os ensaios em paralelo (por dois técnicos de bancada), assim como a sementeira em duplicado (o mesmo técnico de bancada), são ferramentas utilizadas para a qualificação de novos técnicos de bancada ou domínio e aprendizagem de novos ensaios.

Após a realização dos ensaios em paralelo e/ou das sementeiras em duplicado, os resultados obtidos são validados, preenchendo a carta de duplicados correspondente. Esta ferramenta, representa o CQ da 1ª linha. Estas ferramentas permitem também obter dados para o cálculo da precisão intermédia e da estimativa da incerteza (CQ da 2ª linha).

4.3. Contagens em duplicado

A contagem em duplicado, baseia-se na escolha aleatória de placas contadas por um analista, devendo ser recontadas pelo mesmo analista ou por outro. Esta ferramenta representa o CQ da 1ª linha, e tem como objetivo, detetar diferenças nas contagens. Para casos em que a contagem é feita pelo mesmo analista, o laboratório aceita a diferença até 5%, e quando é feita por analistas diferentes, aceita-se diferença até 10%. Esta ferramenta, também pode ser utilizada como ferramenta para CQ da 2ª linha numa perspetiva de avaliação de tendências dos analistas.

4.4. Controlo com material de referência

O uso de material de referência (MR) para o controlo positivo ou negativo (qualitativo), representa o CQ da 1ª linha. O seu uso, é sempre feito em cada série de análises, independentemente da frequência e da quantidade de parâmetros de análises a realizar.

Os materiais de referência também são utilizados para o controlo da qualidade dos meios de cultura e para a realização de amostras cegas.

A preparação, manutenção e controlo dos materiais de referência do laboratório foi sempre realizada de acordo com o procedimento específico do laboratório para o manuseamento deste tipo de materiais.

4.5. Controlo dos meios de cultura após preparação

O CQ dos meios de cultura, tem como objetivo determinar os parâmetros de esterilidade, produtividade, seletividade e especificidade.

Na sua aquisição, os meios são acompanhados de um certificado de qualidade, que é avaliado para verificar o cumprimento com os requisitos da norma ISO 11133:2014 e do laboratório.

Após a preparação do meio, são avaliadas as características visuais, tais como a cor, o aspeto e a consistência, de igual modo, as características físicas (pH), que devem estar de acordo com as indicações do fornecedor. O meio de cultura é rejeitado, caso se encontre fora dos limites especificados.

4.6. Controlo de esterilidade

O seguinte ensaio aplica-se para verificar a ausência de contaminação de microrganismo nos meios de cultura.

Para cada lote de meio de cultura preparado no laboratório é retirado uma percentagem de tubos ou placas que se incubam nas condições de tempo e temperatura descritas no método de ensaio do organismo que se pretende pesquisar. Ao fim deste tempo, não deverá haver qualquer alteração de cor, turvação, depósito ou gás nem crescimento de colónias, caso contrário o lote deverá ser rejeitado.

4.7. Cartas de produtividade

A produtividade é definida como o nível de recuperação do microrganismo alvo no meio de cultura em condições definidas e a seletividade, como o grau de inibição de um organismo não alvo no mesmo meio e nas mesmas condições. A especificidade, por seu lado, é demonstrada pela capacidade de microrganismos não alvo não serem inibidos, mas apresentarem, no mesmo meio e nas mesmas condições, características visuais diferentes do microrganismo alvo. A norma ISO 11133:2014 estabelece critérios para a realização e avaliação destes parâmetros de controlo da qualidade.

Em rotina o laboratório utiliza os MR para fazer o controlo dos meios de cultura, diluentes e reagentes utilizados nas análises. Sempre que se prepara um novo lote de meio, são realizados os testes de produtividade/seletividade/especificidade. Os resultados de produtividade são introduzidos numa carta de controlo (carta de produtividade), o que permite saber se o meio ainda é adequado para a realização dos ensaios analíticos (CQ de 1ª linha).

A carta de produtividade é construída com os primeiros valores obtidos (pelo menos 10 inicialmente e depois atualizada quando se atingir aos 20) e são estabelecidos os limites de aviso, de controlo e critérios de aceitação, para que possa ser utilizada em rotina de forma a detetar possíveis situações anormais ou as que possam ocorrer (CQ de 2ª linha)

4.8. Amostras cegas

O uso de amostras cegas baseia-se na contaminação interna das amostras utilizando o Material de Referência (MR), com o objetivo de conhecer a precisão e exatidão dos resultados produzidos. Geralmente, as amostras cegas, são utilizadas em conjunto com os duplicados, para conhecer e avaliar o desempenho dos operadores, nomeadamente estagiários, funcionando com ferramenta de melhoria da qualidade.

A utilização de MR (quantitativos) ou padrões análogos, como amostras cegas, permite também conhecer a exatidão do método.

O laboratório considera, para todos os efeitos, as amostras dos ensaios interlaboratoriais como amostras cegas, na avaliação do seu desempenho.

4.9. Ensaio interlaboratoriais

A realização de ensaios de comparação interlaboratoriais, representa um CQ externa da 3ª linha. A ferramenta EIL (ensaio interlaboratoriais) é referente à realização e avaliação de ensaios do mesmo item ou matéria, por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições pré-estabelecidas pela entidade promotora.

A participação neste tipo de ensaios, permite ao laboratório fazer a sua avaliação de desempenho, conhecendo a qualidade dos resultados obtidos, face aos resultados esperados para esse ensaio.

A participação em ensaios de comparação interlaboratorial é um procedimento obrigatório pelo IPAC para a acreditação de método analítico num laboratório de ensaios e/ou calibração.

Anualmente a ALS Controlvet subscreve programas de ensaios interlaboratoriais organizados por entidades competentes nos âmbitos de microbiologia de alimentos, superfícies, águas de consumo, águas balneares, águas residuais e na área veterinária. As amostras são analisadas pelo laboratório da ALS Controlvet e os resultados são enviados ao laboratório organizador.

Os ensaios interlaboratoriais são uma ferramenta importante no controlo da qualidade analítica do laboratório da ALS Controlvet. Contudo, para uma interpretação correta de resultados dos ensaios interlaboratoriais realizados na área da microbiologia é importante considerar os seguintes fatores que influenciam os resultados:

1. A distribuição dos microrganismos na amostra não é uniforme, mesmo em amostras bem homogeneizadas, assim quando se utiliza parte da amostra para análise os resultados obtidos dependem da quantidade de microrganismo presentes na toma utilizada. A inevitável distribuição aleatória dos microrganismos numa amostra faz com que nunca se conheçam os resultados verdadeiros para uma análise efetuada a partir de uma porção dessa amostra.
2. Para além da variedade que pode existir entre as subamostras, as amostras que contém organismos, como as bactérias, podem multiplicar-se ou tornarem-se inviáveis apesar de todos os esforços feitos para estabilizar as amostras. A estabilidade de facto varia entre os vários tipos de microrganismos e mesmo entre estirpes. O comportamento microbiano pode ainda ser diferente de acordo com a mistura presente na amostra.
3. Existem ainda fenómenos de atração e repulsão entre microrganismos que conduzem a uma sobre disposição, ou seja, apesar de todos os esforços para homogeneizar as amostras não se consegue ultrapassar as forças de atração ou de repulsão entre os microrganismos. Isto faz com que possam existir zonas da amostra com agregados de microrganismos e outras com vazios microbianos. Assim é de esperar que algumas vezes se obtenham contagens

de um ou outro microrganismo como “elevadas” ou como “baixas” após o tratamento estatístico dos resultados utilizando a mediana dos resultados obtidos e tendo em conta o afastamento do resultado reportado pelo laboratório relativamente á mediana. Estes resultados não devem ser interpretados como um mau desempenho do laboratório.

Assim sendo, o desempenho do laboratório deve ser avaliado a partir de uma análise dos resultados ao longo do tempo.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. A unidade de microbiologia aplicada

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de microbiologia intitulado ALS Controlvet, apresentado o logótipo na Figura 1. A rede Europeia da ALS conta com laboratórios analíticos modernos, com acreditação ISO 17025 e Centros de Serviço ao Cliente.

Variando em dimensão e capacidade local, a rede de laboratórios possui, no entanto, uma gama ampla de análises físicas, químicas, microbiológicas, biológicas, radiológicas, ecotoxicológicas para satisfazer as necessidades locais e regionais dos clientes.

Todos os procedimentos analíticos da ALS são validados e na sua maioria acreditados segundo a norma europeia EN ISO/IEC 17025:2005. E o controlo de qualidade é um processo sistemático que engloba entre outros:

- a) Calibração regular dos instrumentos
- b) Verificação regular da calibração por normas independentes
- c) Medição regular de amostras brancas
- d) Medição regular de amostras de controlo
- e) Medição de amostras duplicadas
- f) Medição regular de amostras de matriz “spiked” e de matrizes de material de referência certificado.

Os procedimentos acima mencionados garantem que o rigor do método (precisão e veracidade) vai ao encontro nas necessidades dos clientes (ALS Portugal).



Figura 1- Logótipo do Laboratório, ALS CONTROLVET.

2. Preparação de meios de cultura

Todos os meios de cultura são preparados a partir de formulações desidratadas e, para a sua preparação são seguidas as indicações presentes na ficha técnica de cada um dos meios. A preparação dos meios de cultura é efetuada segundo as indicações do fabricante ou das normas respetivas, tendo o cuidado de evitar a libertação de pó e a formação de grumos.

O meio desidratado foi pesado para frascos de vidro, tomando as devidas condições de segurança, no qual, depois foi adicionada a água desionizada respetiva, medida previamente numa proveta. De seguida procedeu-se à homogeneização e os meios foram submetidos ao processo de esterilização de acordo com as indicações provenientes do fabricante.

Para todos eles, o processo de esterilização consiste no método do calor húmido, estando sujeito a um programa de no autoclave. Neste método, os meios de cultura têm de estar sujeitos durante um período de tempo a uma temperatura específica, para provocar a morte dos microrganismos nele presentes, uma vez que eles não são inativados instantaneamente (Lightfoot e Maier, 2006).

Consequentemente, os meios de cultura e as soluções preparadas são distribuídas em frascos, tubos ou placas consoante o tipo de ensaio a que se destinam e às necessidades do Laboratório.

Assim, após a retirada do autoclave, procedeu-se à distribuição dos meios sólidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, onde foram colocados 18 a 20 mL de meio em cada placa, e dos meios líquidos em tubos de ensaio estéreis onde foram colocados 10 mL de meio em cada tubo.

Para os meios de cultura prontos com adição de suplemento, a sua preparação foi efetuada de acordo com a ficha técnica do meio de cultura.

De modo a garantir a sua rastreabilidade, todos os meios, diluentes e soluções preparados no laboratório de microbiologia, são devidamente identificados com o lote atribuído pelo laboratório, que consta na folha de registo da preparação de meios, e a respetiva data de validade.

2.1. Conservação dos meios de cultura, diluentes e/soluções

Os diluentes e meios de cultura preparados são conservados, consoante a indicação expressa na norma ou do seu fabricante. Geralmente, estes são conservados em frasco/tubo rolhado, ao abrigo da luz a cerca de 5 ± 3 °C, durante um período máximo de três meses ou um mês à temperatura ambiente, de modo a evitar qualquer modificação da composição e desde que não ultrapasse o prazo de validade estabelecido pelo fabricante (ISO11133:2014).

Salvo as indicações das respetivas normas ou as do fabricante, as soluções necessárias para testes de confirmações são conservadas em frascos escuros fechados, à temperatura de 5 ± 3 °C, e por um período máximo de três meses.

3. Manutenção de culturas de referência

Segundo Brumano et al (2011), o congelamento, é o método mais comum de conservação de culturas bacterianas em laboratórios. No Laboratório de microbiologia, a manutenção de culturas de referências é realizada de acordo com o descrito na norma ISO 11133:2014.

De acordo com esta norma, as culturas utilizadas na manutenção de material de referência, têm sempre como fonte de origem estirpes de referência, obtidas a partir de uma coleção oficial, do World Date Centre of Microorganisms (WDCM), que são adquiridas sob a forma liofilizada. Estas devem ser reconstituídas de acordo com as instruções do fornecedor.

A técnica de ultracongelação é realizada através do congelamento da cultura com a adição de glicerol a 20 %. Neste caso, a cultura de referência, pode ser congelada à temperatura de -80 °C (stock de referência) durante três anos, ou a -20 ± 3 °C (stock de cultura) durante um ano.

Para a realização de testes de produtividade/seletividade/especificidade são também preparados stocks de inóculo a partir do stock de cultura, em concentrações adequadas para os testes, segundo a ISO 11133:2014 e conservado a -20 ± 3 °C.

Assim como refere a ISO 11133:2014, sempre que se descongela um material de referência (em stock de referência, de cultura ou de inóculo), não se volta a congelar, descartando-o após utilização.

3.1. Preparação de culturas de stock de referência

As culturas de stock de referência são preparadas a partir de estirpes de referência ou isoladas de ensaios interlaboratoriais e devem ser mantidas e manuseadas de forma a minimizar qualquer contaminação cruzada, mutação ou alteração das características dos organismos.

A partir do material de referência ou cultura do EIL, inocula-se no meio apropriado de forma a obter cultura abundante e incuba-se nas condições adequadas a cada microrganismo. Após incubação verifica-se a pureza da cultura.

Prepara-se uma suspensão em meio crioprotetor (Nutrient broth com 20 % de glicerol) e armazena-se a -80 °C, onde as bactérias são conservadas durante 10 anos, ou a -20 °C, com uma validade de um ano.

Os criotubos são identificados com o código e nome da estirpe bem como a data de produção e validade.

A unidade de microbiologia tem um modelo, onde é registado todo o processo de produção de culturas de Stock de referência.

As culturas de stock de referência nunca podem ser usadas para preparar materiais de referência.

3.2. Preparação de culturas de stock

As culturas de stock são geralmente preparadas a partir de uma cultura de stock de referência armazenada a -80 °C.

As alíquotas devem ser manuseadas de modo a evitar possíveis contaminações cruzadas do stock de referência ou da sua deterioração.

A partir da cultura stock de referência, inocula-se em meio apropriado de forma a obter-se uma cultura abundante e incuba-se nas condições adequadas a cada microrganismo. Após a incubação, verifica-se a pureza da cultura, através da coloração

de Gram ou testes bioquímicos. Dessa cultura densa, prepara-se uma suspensão em meio crioprotetor (Nutrient broth com 20 % de glicerol) e conserva-se múltiplas porções a -20 °C. Os criotubos devem ter a designação da estirpe bem como a data de produção e validade.

De uma forma geral, são preparados tubos de culturas de stock em quantidade suficiente de modo a ser utilizado um por cada mês do ano.

As culturas de stock nunca podem ser utilizadas para preparar os materiais de referência ou culturas de stock de referência.

3.3. Preparação de culturas de trabalho

As culturas de trabalho são preparadas a partir das culturas de stock e dependendo da utilização prevista pode-se preparar culturas de trabalho em meio líquido ou em placa, sendo preparadas no início de todas as semanas.

A preparação em meio líquido passa por se retirar o criotubo, do mês corrente, e deixar descongelar a suspensão o suficiente para permitir uma correta homogeneização.

De seguida transfere-se 10 µL da suspensão, com o auxílio de uma ansa, para o tubo com um meio enriquecedor, como BHI ou Nutrient Broth e agita-se no vortéx.

A incubação é realizada entre as 18 -24 horas, a 37 °C, podendo estas condições ser ajustadas de acordo com o microrganismo, como é o caso do *Clostridium prefringens*, em que a incubação é em Tioglicolato a 18 - 24 horas a 37 °C, em anaerobiose. Nos bolores, a incubação é feita a 25 °C durante 48 - 72horas.

Após a incubação deve-se verificar a multiplicação da cultura através da turvação da mesma. De seguida, conserva-se as culturas em refrigeração a 5 ± 3° C, durante um período máximo de 8 dias.

A preparação em placa passa por retirar da congelação o tubo de cada mês e deixar descongelar a suspensão o suficiente para permitir uma correta homogeneização. Transfere-se 1 µL da suspensão, com o auxílio de uma ansa, para a placa com meio nutritivo não seletivo, em superfície, de forma a obter cultura pura e isolada.

Utiliza-se TSA (Tryptone Soya Agar) como meio nutritivo e incuba-se a 18 - 24 horas a 37 °C, exceto para microrganismos como o *Clostridium perfringens* e bolores/leveduras que utilizam meios como Agar sangue e Sabouraud, respetivamente.

A incubação é realizada durante um período de 18 - 24 horas a 37 °C, no caso do *Clostridium perfringens*, a incubação é feita em anaerobiose. Quanto aos bolores a sua incubação é realizada a 25 °C durante 48 - 72 horas (ISO 11133:2014).

As culturas de trabalho produzidas são identificadas com o número da cultura original, ano, mês e dia.

3.4. Preparação de suspensões para teste

Para se prepararem as suspensões para os testes, foi necessário a realização de diluições decimais sucessivas a partir da cultura de trabalho utilizando um diluente adequado, como por exemplo TS (Tryptone Salt broth), de forma a ser utilizada a diluição com o número de microrganismos adequado para cada meio e para cada teste.

Assim, do tubo com a suspensão mãe, após agitação no aparelho Vórtex, pipeta-se 1 mL dessa suspensão para outro tubo com 9 ml de TS obtendo-se a diluição 10^{-1} e assim sucessivamente (ISO 6887-1:2017).

De forma avaliar a concentração da cultura de trabalho, são realizada sementeiras de 0.1 mL do inóculo de diferentes diluições à superfície em TSA para microrganismos aeróbios e incuba-se a 37 °C, durante 18 a 24 horas, ou em agar sangue no caso dos microrganismos anaeróbios e incuba-se a 37 °C durante 18 a 24 horas em condições anaerobioses.

As suspensões devem ser utilizadas até duas horas à temperatura ambiente, caso não sejam utilizadas devem-se conservar em refrigeração a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (ISO 11133:2014).

A partir da concentração conhecida, através do procedimento acima descrito, é determinada a diluição e o volume adequado a utilizar como inóculo para os efeitos pretendidos no controlo de qualidade a realizar.

Na rotina do Laboratório, semanalmente, passam-se as culturas de trabalho para um meio líquido enriquecedor e para um meio nutritivo não seletivo, como está explícito

no subcapítulo 3.3, de modo a obter cultura pura e isolada. Do dia seguinte, prepara-se as suspensões para teste através do procedimento descrito neste subcapítulo.

Posteriormente, obtém-se a leitura das contagens das diluições realizadas anteriormente e estas são registadas num modelo, MOD 225, de forma a rastrear todo este processo. Assim, sempre que for preciso determinar uma concentração consulta-se o MOD 225 de forma a avaliar a diluição utilizar.

4. Controlo da qualidade dos meios de cultura

O objetivo do controlo da qualidade de meios de cultura é, garantir a confiança de que os microrganismos-alvo serão sempre recuperados com uma determinada sensibilidade (Lightfoot & Maier, 2003). No Laboratório, os meios de cultura são normalmente testados com microrganismos de referência.

O Laboratório avalia os certificados da qualidade dos meios de cultura, emitidos pelo fabricante, por lote de meio, e verifica se o lote em questão cumpre com os requisitos do controlo de qualidade exigidos pela Norma ISO 11133:2014.

Como já foi referido anteriormente, para cada meio de cultura os testes de desempenho que são necessários realizar são específicos para cada um deles, estando presentes nos anexos E e F da ISO 11133:2014 (ISO 11133:2014).

4.1. Testes de desempenho dos meios sólidos

Para os meios de cultura e reagentes prontos a usar, o Laboratório avalia a qualidade através do desempenho nos controlos da qualidade estabelecidos como o ensaio em branco, o controlo positivo de execução, a análise de matérias de referência e na participação em EIL's.

Por cada lote de fornecedor é realizado um teste de esterilidade, e é feita uma avaliação qualitativa ao meio de cultura. A qualidade é ainda verificada através do desempenho nos controlos de qualidade estabelecidos como o controlo positivo de execução e as confirmações bioquímicas.

Para os meios de cultura e diluentes adquiridos na forma desidratada, a preparação é efetuada de acordo com as instruções do fabricante. Consequentemente,

os meios de cultura e as soluções preparadas são distribuídas em frascos, tubos ou placas consoante o tipo de ensaio a que se destinam e às necessidades do Laboratório. Estes são devidamente identificados com o nome do meio e o número do lote interno.

Para cada lote de meio de cultura produzido efetua-se um controlo físico, ou seja, é avaliada a cor, o aspeto, a consistência e o pH. Caso se verifique valores diferentes aos estabelecidos pelo fabricante, conduz-se à rejeição do lote.

O Laboratório efetua uma avaliação quantitativa dos meios de cultura nas seguintes situações:

- 1) Por cada novo lote de fornecedor;
- 2) Quando o meio de cultura se destina a ser utilizado noutra Laboratório;
- 3) Sempre que se ultrapassem seis meses após a abertura da embalagem original do produto.

Esta avaliação culmina na emissão de um certificado de avaliação interna com todos os resultados dos parâmetros avaliados.

4.1.1. Produtividade

A produtividade é o nível de recuperação do microrganismo-alvo do meio de cultura.

De acordo com o definido na ISO 11133:2014 para cada meio de cultura, a avaliação da produtividade pode ser realizada por teste qualitativo ou quantitativo.

a) Teste qualitativo

Com uma ansa de 1 µL efetua-se um riscado no meio de cultura em teste, dos diferentes microrganismos a testar de forma a que não ocorram cruzamentos. Submeter os meios de cultura assim inoculados às condições de tempo e temperatura descritos pelos respetivos métodos.

Após a incubação das placas o crescimento deverá ser classificado de acordo com:

- 0 – Sem crescimento.
- 1 – Crescimento fraco (número de colónias e tamanho).
- 2 – Bom crescimento.

A avaliação qualitativa da produtividade é efetuada a todos os lotes internos produzidos, recorrendo às culturas de trabalho. Sempre que houver um novo lote de fornecedor, a avaliação é efetuada utilizando um inócuo entre 10^3 e 10^4 UFC de acordo com o definido na ISO 11133:2014.

Para cada meio de cultura o critério de aceitação da produtividade encontra-se definido na ISO 11133:2014.

b) Teste quantitativo

A partir das suspensões preparadas e tendo em conta o meio de cultura em teste, deve-se escolher a diluição de forma a obter contagens entre 80 e 120 UFC/mL, podendo considerar contagens com um mínimo de 50 UFC por placa (ISO 11133:2014). Inocular o mesmo volume no meio de cultura em teste e no meio de cultura em referência.

Sendo assim, o rácio da produtividade é dado pela seguinte equação:

$$Pr (\%) = \frac{N_s}{N_0} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

Pr - produtividade do meio de cultura em estudo

N_s - número de UFC obtidas no meio de cultura em teste

N_0 - número de UFC obtidas no meio de cultura de referência.

Para cada meio de cultura o critério de aceitação da produtividade encontra-se definido na ISO 11133:2014. Nos meios de cultura sólidos o critério de aceitação geralmente, varia entre $Pr \geq 0.5$ ou $Pr \geq 0.7$ consoante o meio de cultura.

4.1.2. Seletividade

A seletividade define-se como o grau de inibição do microrganismo não alvo (ISO 11133:2014), ou seja, a capacidade de impedir o crescimento de microrganismos indesejados, permitindo o crescimento dos microrganismos pretendidos.

A avaliação da seletividade dos meios de cultura preparados no Laboratório é efetuada utilizando as culturas de trabalho das estirpes definidas pela ISO 11133:2014.

Para os meios de cultura em placa, utiliza-se uma suspensão com pelo menos 10^4 UFC/ mL. Com uma ansa de 1 μ L, a partir da cultura trabalho, realiza-se uma estria no meio de cultura em teste, com os diferentes microrganismos. Submeter os meios de cultura assim inoculados às condições de tempo e temperatura recomendadas.

A avaliação qualitativa da seletividade é efetuada para todos os lotes internos produzidos.

O critério de aceitação da seletividade dos meios de cultura é a inibição dos microrganismos não alvo, ou seja, é a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos indesejados. Assim, os meios de cultura em teste são aceites e utilizados no Laboratório se inibirem os microrganismos não alvo, conforme a ISO 11133:2014.

4.1.3. Especificidade

A especificidade é demonstrada pela capacidade de microrganismos não alvo não serem inibidos, mas apresentarem, no mesmo meio e nas mesmas condições, características visuais diferentes do microrganismo alvo (ISO11133:2014).

A especificidade do meio em teste é avaliada usando um inóculo, com pelo menos, 10^3 UFC /mL.

O critério de aceitação da especificidade dos meios de cultura é as características visuais serem diferentes dos microrganismos alvo. Assim, os meios de cultura em teste são aceites e utilizados no Laboratório se apresentarem características visuais diferentes do microrganismo alvo e de acordo com a ISO 11133:2014.

4.2. Testes de desempenho dos meios que utilizam membranas filtrantes

A avaliação dos meios de cultura que utilizam membranas filtrantes, utiliza as suspensões de microrganismos alvo, preparadas a partir das culturas de trabalho das estirpes.

A qualidade das membranas filtrantes utilizadas deve ser previamente avaliada para demonstrar a sua eficácia de utilização (ISO 7704:2015).

A filtração deve cumprir com os requisitos da norma específica do método, se necessário passar o inóculo pelas membranas, em condições de assepsia e colocar as membranas sobre o meio de cultura e incubar, de forma a obter um resultado aproximado de 100 UFC no total para a avaliação de produtividade (ISO 8199:2018).

Na Figura 2 está representada a sequência dos procedimentos a executar na avaliação da produtividade dos meios que utilizam membranas filtrantes.

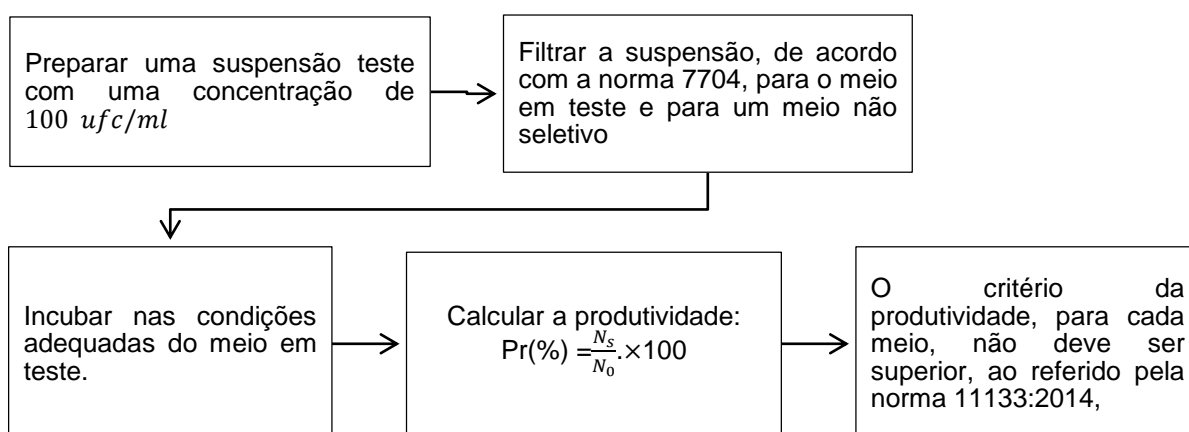


Figura 2- Esquematização do método quantitativo para avaliar a produtividade dos meios que utilizam membranas filtrantes. **Fonte:** Adaptado de ISO 11133:2014

Segundo a ISO 11133:2014, a avaliação da seletividade e da especificidade para os meios de cultura que utilizam membranas filtrantes é de carácter qualitativo, ou seja, efetua-se um riscado no meio de cultura em teste, dos microrganismos a testar, que estão referidos na norma. Depois da incubação, nas condições específicas, avalia-se a presença ou ausência do crescimento nas placas, segundo o critério de aceitação do meio referido na norma.

4.3. Testes de desempenho dos meios líquidos

4.3.1. Meios de enriquecimento seletivo

Os meios líquidos de enriquecimento seletivo são meios que permitem a multiplicação de microrganismos específicos, enquanto o crescimento de outros microrganismos é parcial ou totalmente inibido (ISO 11133:2014).

A avaliação da produtividade destes meios é efetuada de acordo com as alíneas a) ou c) e a seletividade com a alínea b), assim:

- a) Para o microrganismo alvo, inocula-se um tubo do meio em teste com um inóculo de ≤ 100 UFC/ mL, incuba-se nas condições adequadas do meio em teste. De seguida, repicar-se com o auxílio, de uma ansa de $10 \mu\text{L}$, para um meio de cultura seletivo.

A avaliação da produtividade do meio em teste é satisfatória se houver um bom crescimento, no mínimo 10 UFC, de microrganismo alvo no meio de cultura seletivo.

- b) Para o microrganismo não alvo, inocula-se um tubo do meio em teste com um inóculo de $> 10^4$ UFC/mL. Incuba-se nas condições específicas do meio em teste. De seguida e com o auxílio de uma ansa, repica-se $10 \mu\text{L}$ para meio de cultura não seletivo. A avaliação da seletividade do meio é satisfatória quando o crescimento de microrganismo não alvo é totalmente ou parcialmente inibido.

- c) A mistura do microrganismo alvo e não alvo consiste, em inocular no mesmo tubo do meio em teste o microrganismo alvo com um inóculo de ≤ 100 UFC/mL e > 1000 UFC/mL de microrganismo não alvo. Este deve ser incubado às condições específicas do meio em teste. De seguida, repica-se $10 \mu\text{L}$ para um meio de cultura seletivo do microrganismo alvo. Assim a produtividade do meio em teste é satisfatória se houver um bom crescimento do microrganismo alvo no meio de cultura seletivo.

Na Figura 3 está representada a sequência do procedimento do teste de desempenho dos meios líquidos seletivos de enriquecimento.

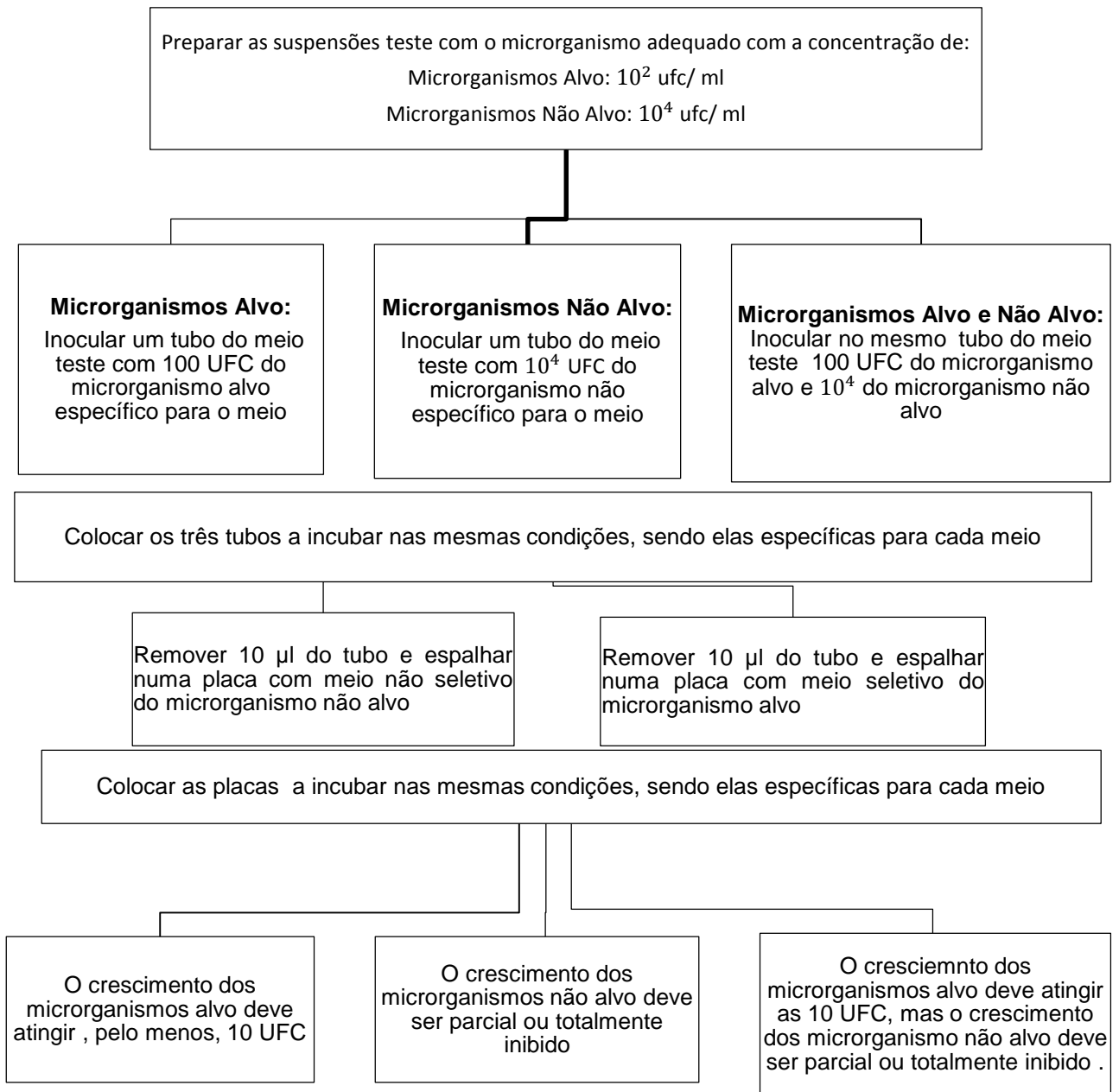


Figura 3- Esquematização do método qualitativo para avaliar o desempenho de meios líquidos seletivos. **Fonte:** Adaptado de ISO 11133:2014

4.3.2. Meios de enriquecimento não seletivos

Os meios líquidos de enriquecimento não seletivos permitem um crescimento de uma ampla variedade de microrganismo (ISO 11133:2014).

A avaliação do desempenho dos meios líquidos não seletivos de enriquecimento é de carácter qualitativo. Esta avaliação está representada na Figura 4.

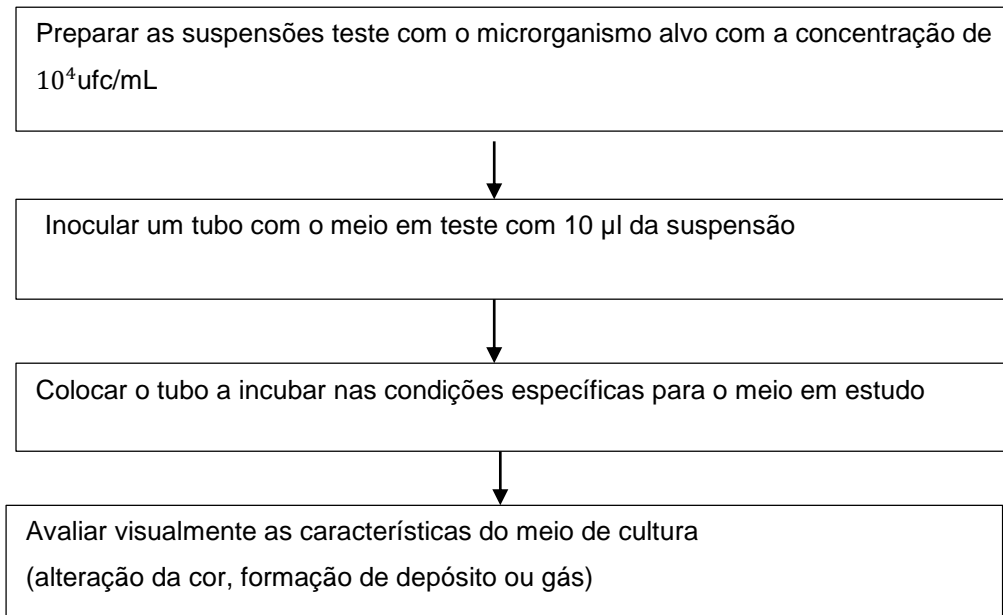


Figura 4-Esquematização do método qualitativo para avaliar o desempenho de meios líquidos não seletivos de enriquecimento. **Fonte:** Adaptado de ISO 11133:2014

4.4. Testes de desempenho dos diluentes

O controlo do diluente é efetuado por cada novo lote de fornecedor e sempre que se ultrapassem seis meses sobre a abertura da embalagem.

O teste de desempenho dos diluentes tem como objetivo determinar a capacidade de o diluente suportar a carga microbiana, sem haver redução ou aumento na mesma (ISO 11133:2014).

O teste realizado para estes meios de cultura é de carácter quantitativo. Foi necessário previamente a preparação da suspensão de trabalho de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e de *Listeria Monocytogenes* com uma concentração de 10^4 ufc/mL. Retira-se 0.1 mL para uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de TSA e regista-se como t_0 .

O tubo do diluente inoculado é colocado à temperatura ambiente durante ± 45 minutos e, após este período retira-se novamente 0.1 mL para outra placa de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de TSA (t_{45}).

As duas placas de TSA são incubadas durante 44 ± 4 horas a 36 ± 2 ° C. Após este tempo são analisados os resultados. O critério de aceitação deste teste consiste na presença de $\pm 30\%$ de colónias na placa (t_{45}) em relação à placa (t_0)(ISO 11133:2014).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Controlo de qualidade ao meio Tryptone Bile X-glucuronide agar

De todos os meios de cultura preparados no Laboratório, escolhi o Tryptone Bile X-Glucuronide agar porque é um meio submetido a todo o processo de controlo referenciado na norma ISO 11133:2014. Este meio de cultura é preparado no Laboratório a partir de uma formulação desidratada e esterilizado convenientemente.

O meio TBX (Tryptone Bile x-Glucuronide agar / Triptona com sais Biliares e X-Glucuronídeo agar) é um meio de cultura sólido seletivo, de cor bege transparente e gelatinoso, com um valor de pH compreendido entre 7,0 e 7,4. É utilizado para enumeração de *E. coli* β -glucuronidase positiva em produtos alimentares. O meio é composto por enzimas digestivas de caseína que vão fornecer azoto e carbono necessários para o crescimento bacteriano, sais minerais que vão inibir o crescimento de bactérias gram positivas e um composto cromogénico que vai diferenciar as bactérias β -glucuronidase positivas uma vez que, estas bactérias libertam uma enzima que divide esse composto, libertando um cromóforo colorido que se acumula no interior das células e é possível de ser detetado pelo aparecimento de colónias azuis, como se pode verificar na Figura 5 (VWR chemicals, 2013).

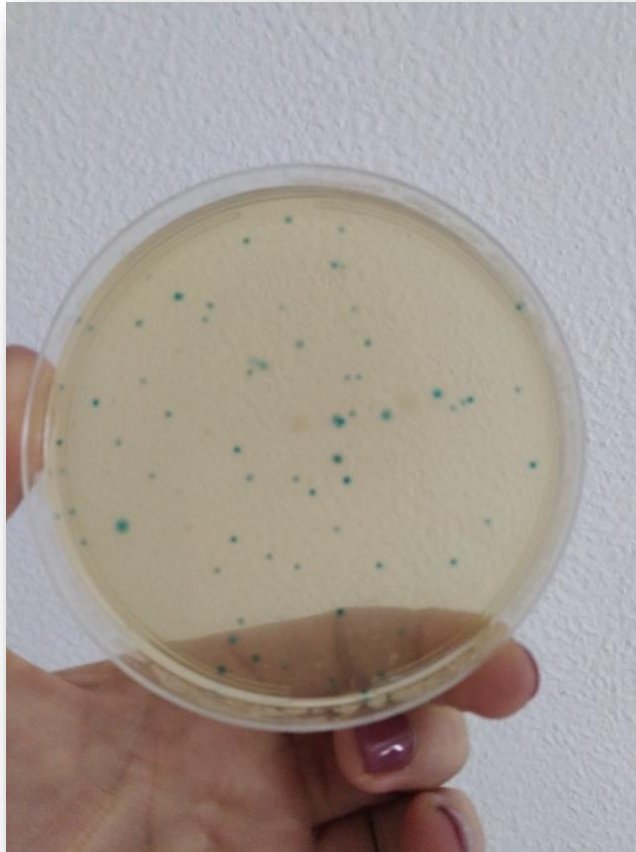


Figura 5- Placa de crescimento de estirpes de *Escherichia coli* β-Glucuronidase positiva em meio TBX.

A composição do meio de cultura TBX (gramas/Litro):

- Triptona: 20,0
- Sais biliares: 1,5
- BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucuronato): 0,075
- Agar bacteriológico: 9,0.

A preparação dos meios de cultura é efetuada segundo as indicações do fabricante. Pesa-se a quantidade adequada ao volume de meio a preparar, de acordo com as indicações fornecidas pelo fabricante. Aquecer-se até ebulição com agitação até completa dissolução do agar, evitando a libertação de pós e a formação de grumos.

O processo de esterilização consiste no método do calor húmido, estando sujeito a um programa no autoclave a 121°C durante 15 minutos.

A temperatura de distribuição deste meio de cultura é de 44 – 47 °C.

Os meios de cultura preparados são conservados, consoante a indicação expressa na norma ou do seu fabricante, o TBX preparado em frasco tem uma validade de 180 dias a 2 – 8 °C protegido da luz. O mesmo meio preparado em placas tem uma validade de 15 dias a 2 – 8 °C, protegido da luz.

Na Tabela 1, encontra-se os critérios de avaliação do desempenho do meio de cultura TBX.

Tabela 1- Critérios de avaliação do desempenho do meio de cultura TBX.

Fonte: Adaptado do certificado do meio de cultura.

| Microorganisms | | Growth (Productivity Ratio : P_R) | Characteristics |
|-------------------------------|------------|---|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | WDCM 00013 | $P_R \geq 50\%$ | Blue colonies |
| <i>Escherichia coli</i> | WDCM 00202 | $P_R \geq 50\%$ | Blue colonies |
| <i>Citrobacter freundii</i> | WDCM 00006 | Not inhibited, score 2 | White colonies |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | WDCM 00025 | Not inhibited, score 2 | White to grey-beige colonies |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | WDCM 00087 | Inhibited, score 0 | - |

1.1. Produtividade

Segunda a ISO 11133:2014, o teste de produtividade para este meio de cultura é de carácter quantitativo, em que os microrganismos utilizados na avaliação de desempenho do meio de cultura é a *Escherichia coli* WDCM 000202 com uma das *Escherichia coli* WDCM 00012 ou *Escherichia coli* WDCM 00013 (ISO11133:2014).

Previamente foi preparada uma suspensão teste de *Escherichia coli* com 10^2 UFC/mL em tubos de 10 mL TS (Tryptone Salt broth). Desse tubo foi retirado 0.1 mL para duas placas de Petri de 90 mm de diâmetro, uma com o meio de TBX e outra com o meio de referência, o TSA, tendo sido feita uma sementeira por incorporação. As placas foram posteriormente colocadas a incubar durante 21 ± 3 horas a 44 ± 1 °C. Após este período de incubação faz-se a contagem das colónias nas duas placas e analisaram-se os resultados.

Relativamente à análise dos resultados, para o meio de cultura ser aceite é necessário obter um valor de $P_r \geq 50\%$, tendo sido apenas contabilizadas colónias característica, ou seja, colónias de coloração azul.

1.2. Seletividade

Segunda a norma 11133:2014, o teste de seletividade para este meio de cultura é de carácter qualitativo. Após a preparação prévia da cultura de trabalho de *Enterococcus faecalis* WDCM 00009 ou *Enterococcus faecalis* WDCM 00087, faz-se um riscado para uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de TBX e coloca-se a incubar durante 21 ± 3 horas a 44 ± 1 °C. Após a incubação analisaram-se os resultados e, o meio é aceite se os *Enterococcus faecalis* forem totalmente inibidos, não havendo crescimento na placa.

Segundo a ISO 11133:2014 o *Enterococcus faecalis* é um microrganismo não alvo no meio de cultura TBX e como se trata da avaliação do desempenho da seletividade, que é definida como o grau de inibição do microrganismo não alvo, é espectável que o *Enterococcus faecalis* seja totalmente inibido no meio de cultura TBX.

1.3. Especificidade

Segunda a norma 11133:2014, o teste de especificidade para este meio de cultura é de carácter qualitativo. E segundo a mesma norma as estripes de controlo utilizadas para a avaliação da especificidade é a *Citrobacter freundii* WDCM 00006 e ou a *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025. Após a preparação prévia da cultura de trabalho, faz-se um riscado para uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de TBX e coloca-se a incubar durante 21 ± 3 horas a 44 ± 1 °C. Após este período avalia-se a presença/ ausência de crescimento na placa.

Para o meio de cultura ser aceite, é necessário o crescimento de colónias brancas e verdes-beges na placa com meio de TBX.

Na avaliação da especificidade é utilizado a *Citrobacter freundii* WDCM 00006 sendo esperado que esta apresente características visuais diferentes do microrganismo alvo, colónias brancas a verde-bege em vez de colónias azuis que são as características dos microrganismos alvo (ISO 11133:2014).

2. Procedimentos da implementação da ferramenta informática

Um sistema de Controlo da Qualidade (QMS - Quality Management System) é um sistema que destaca as políticas e procedimentos necessários para a melhoria e controle dos diversos processos desenvolvidos por uma organização(ISO 9001:2015).

No Laboratório da ALS Controlvet são preparados, diariamente, diversos meios de cultura em que é implementado o controlo da qualidade segundo a norma (ISO 11133:2014). A implementação do controlo da qualidade envolve diferentes documentos e muitos conceitos, tornando este processo pouco prático e demorado, sendo necessário melhorar e automatizar este processo.

O objetivo consiste em ter uma ferramenta informática que permite fazer toda esta gestão do controlo da qualidade dos meios de cultura, a partir de uma aplicação informática no “LAB “que gere a informação de forma automática, na Figura 6 está apresentado o Logótipo da aplicação.

A ALS Controlvet, considera as tecnologias de informação como uma das formas de diferenciação do mercado onde se insere. Assim o desenvolvimento de aplicações informáticas de apoio as atividades desenvolvidas é encarada como uma forma de otimização de recursos, redução de fonte de erros, redução de tempo de resposta ao cliente.

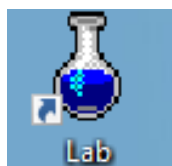


Figura 6- Logótipo da aplicação LAB, da ALS Controlvet.

2.1. Template

Um template é um modelo a ser seguido, com uma estrutura predefinida que facilita o desenvolvimento e criação de um conteúdo previamente construído e permite criar um código de programação de forma rápida.

No Laboratório criou-se um template que permite fazer uma rastreabilidade do processo analítico do controlo da qualidade. Na Figura 7, pode-se observar a estrutura do template aplicado aos meios de cultura do laboratório.

Neste template é descrito o meio de cultura, o lote interno, o controlo da qualidade a efetuar ao meio de cultura e ainda as datas de produção e receção do meio de cultura bem como a data da cultura de trabalho, sendo assim possível a rastreabilidade do processo.

| A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N |
|-----------|----------|--------|-----------------------------------|---------|---------|------------------|------|--------------|-------------------------------|-----------------------|-------|-------------------------|--------------|
| Data Prod | Data Rec | DATA M | Data Cultura de Trabalho | Cliente | Unidade | Meio Cultu | Lote | Lote Aditivo | Referência | Produto | Class | Controlos a efectu | Pacote de en |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Bacillus | | | Bacillus L 00-01-1900 | Bacillus L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 404 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | BP+RPF | | | BP+RPF L 00-01-1900 | BP+RPF L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 426 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | BP egg yolk | | | BP egg yolk L 00-01-1900 | BP egg yolk L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 405 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Bile esculine | | | Bile esculine L 00-01-1900 | Bile esculine L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 406 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Verde Brillhante | | | Verde Brillhante L 00-01-1900 | Verde Brillhante L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 407 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | APT Ad. | | | APT Ad. L 00-01-1900 | APT Ad. L Ad | MC | Prod+Steri | 427 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Glutamato | | | Glutamato L 00-01-1900 | Glutamato L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 408 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | CCA | | | CCA L 00-01-1900 | CCA L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 410 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | CN | | | CN Pseudomonas L 00-01-1900 | CN Pseudomonas L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 409 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Pseudomonas | | | Compass L 00-01-1900 | Compass L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 411 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Compass | | | DEV L 00-01-1900 | DEV L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 412 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | DEV | | | DG18 L 00-01-1900 | DG18 L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 413 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | DG18 | | | DRBC L 00-01-1900 | DRBC L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 414 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | DRBC | | | Half-Fraser L 00-01-1900 | Half-Fraser L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 428 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Half-Fraser | | | Lactose sulfito L 00-01-1900 | Lactose sulfito L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 415 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Lactose sulfito | | | MLSA L 00-01-1900 | MLSA L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 416 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | MLSA | | | MSRV L 00-01-1900 | MSRV L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 435 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | MSRV | | | PCA L 00-01-1900 | PCA L Ad | MC | Prod+Steri | 417 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | PCA | | | Rapid Salmonella L 00-01-1900 | Rapid Salmonella L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 418 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Rapid | | | Rapid EB L 00-01-1900 | Rapid EB L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 419 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Rapid EB | | | Rappaport L 00-01-1900 | Rappaport L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 429 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Rappaport | | | Sabouraud L 00-01-1900 | Sabouraud L Ad | MC | Prod+Steri | 420 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Sabouraud | | | Slanetz L 00-01-1900 | Slanetz L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 421 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Slanetz | | | TBX L 00-01-1900 | TBX L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 422 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | TBX | | | TSA L 00-01-1900 | TSA L Ad | MC | Prod+Steri | 430 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | TSA | | | TSC L 00-01-1900 | TSC L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 423 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | TSC | | | TSI L 00-01-1900 | TSI L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 431 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | TSI | | | Ureia L 00-01-1900 | Ureia L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 432 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Ureia | | | VRBL L 00-01-1900 | VRBL L Ad | MC | Steri+Prod+Select+Speci | 424 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | VRBL | | | VRBG L 00-01-1900 | VRBG L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 425 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | VRBG | | | XLD L 00-01-1900 | XLD L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 436 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | XLD | | | Yeast extract L 00-01-1900 | Yeast extract L Ad | MC | Prod+Steri | 437 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Yeast extract | | | Glucose OF L 00-01-1900 | Glucose OF L Ad | MC | Steri+Prod+Select | 400 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Glucose OF | | | Triptona sal L 00-01-1900 | Triptona sal L Ad | MC | Steri | 403 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | Triptona sal | | | APT (diag.) L 00-01-1900 | APT (diag.) L Ad | MC | Prod+Steri | 434 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | APT (diag.) | | | APT (diluyente) L 00-01-1900 | APT (diluyente) L Ad | MC | Steri | 403 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | APT (diluyente) | | | BHIL L 00-01-1900 | BHIL L Ad | MC | Prod+Steri | 537 |
| | | | Data Cultura de Trabalho 00-01-19 | 3001 | CQM | BHIL | | | | | | | |

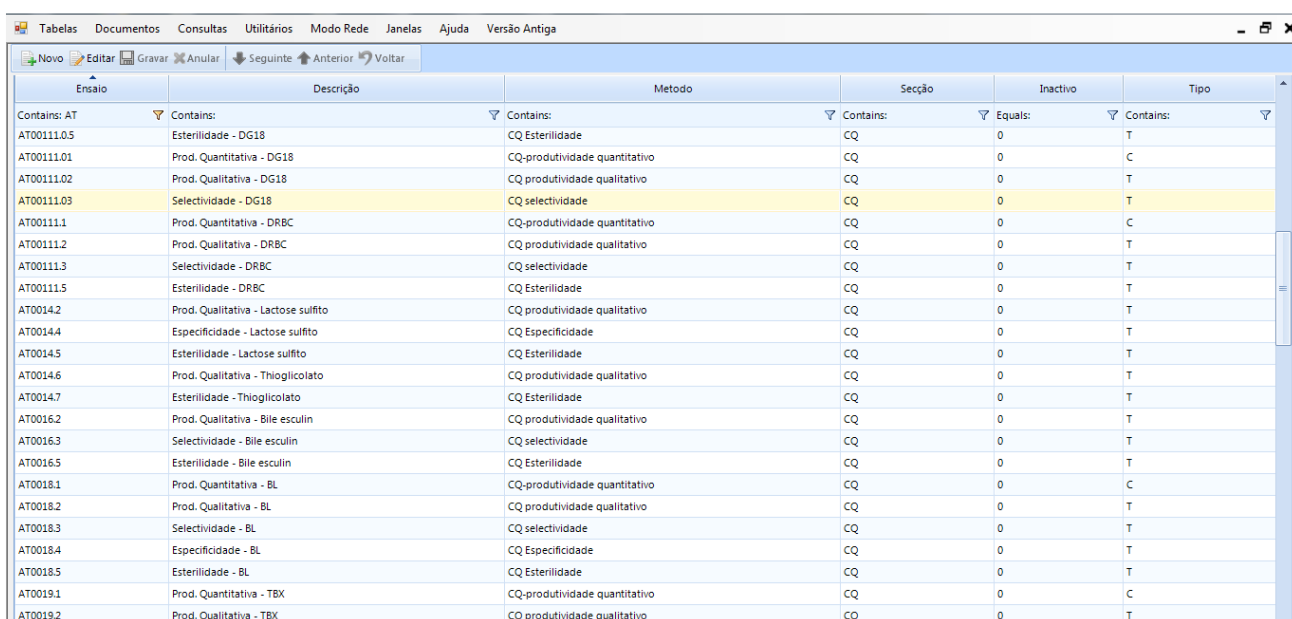
Figura 7- Modelo do Template utilizado no laboratório que permite fazer a rastreabilidade do processo analítico do CQ.

2.2. Ensaio

Na ALS Controlvet são produzidos, diariamente, diversos meios de cultura em que é implementado o controlo de qualidade segundo a norma 11133:2014. Daí a necessidade de ter uma ferramenta informática que permite fazer toda esta gestão do controlo da qualidade dos meios de cultura, a partir de uma aplicação informática no “LAB” que gere a informação de forma automática.

Para isso, é necessário criar ensaios para todos os meios produzidos no Laboratório. O *software* permite criar ensaios do controlo de qualidade.

Para demonstrar a funcionalidade de gerar a informação de forma automática, a Figura 8, apresenta os ensaios para os meios de cultura existente, extraídos na aplicação “LAB”.



| Ensaio | Descrição | Metodo | Secção | Inactivo | Tipo |
|--------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------|----------|-----------|
| Contains: AT | Contains: | Contains: | Contains: | Equals: | Contains: |
| AT00111.05 | Esterilidade - DG18 | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT00111.01 | Prod. Quantitativa - DG18 | CQ-produtividade quantitativo | CQ | 0 | C |
| AT00111.02 | Prod. Qualitativa - DG18 | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT00111.03 | Selectividade - DG18 | CQ selectividade | CQ | 0 | T |
| AT00111.1 | Prod. Quantitativa - DRBC | CQ-produtividade quantitativo | CQ | 0 | C |
| AT00111.2 | Prod. Qualitativa - DRBC | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT00111.3 | Selectividade - DRBC | CQ selectividade | CQ | 0 | T |
| AT00111.5 | Esterilidade - DRBC | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT0014.2 | Prod. Qualitativa - Lactose sulfito | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT0014.4 | Especificidade - Lactose sulfito | CQ Especificidade | CQ | 0 | T |
| AT0014.5 | Esterilidade - Lactose sulfito | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT0014.6 | Prod. Qualitativa - Thioglicolato | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT0014.7 | Esterilidade - Thioglicolato | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT0016.2 | Prod. Qualitativa - Bile esculin | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT0016.3 | Selectividade - Bile esculin | CQ selectividade | CQ | 0 | T |
| AT0016.5 | Esterilidade - Bile esculin | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT0018.1 | Prod. Quantitativa - BL | CQ-produtividade quantitativo | CQ | 0 | C |
| AT0018.2 | Prod. Qualitativa - BL | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |
| AT0018.3 | Selectividade - BL | CQ selectividade | CQ | 0 | T |
| AT0018.4 | Especificidade - BL | CQ Especificidade | CQ | 0 | T |
| AT0018.5 | Esterilidade - BL | CQ Esterilidade | CQ | 0 | T |
| AT0019.1 | Prod. Quantitativa - TBX | CQ-produtividade quantitativo | CQ | 0 | C |
| AT0019.2 | Prod. Qualitativa - TBX | CQ produtividade qualitativo | CQ | 0 | T |

Figura 8- Ensaio do CQ dos meios de cultura, extraídos na aplicação “LAB”.

No Laboratório criaram-se ensaios qualitativos e quantitativos de produtividade bem como ensaios de especificidade, seletividade e esterilidade para os meios de cultura.

Para criar um novo ensaio do CQ dos meios de cultura é necessário ir ao separador “Novo” e preencher os dados gerais (Figura 9) inerentes ao CQ dos meios de cultura, como a secção, o método e o tipo de análise.

Figura 9- Exemplo do registo de um novo ensaio do CQ dos meios de cultura- Dados gerais.

2.3. Métodos

Estando o ensaio criado é necessário configurar as tarefas, ou seja, criar parâmetros relevantes da análise como a diluição utilizada, o volume inoculado, a utilização do MR e da leitura da análise. Na Figura 10, incluí as tarefas configuradas ao método a aplicar.

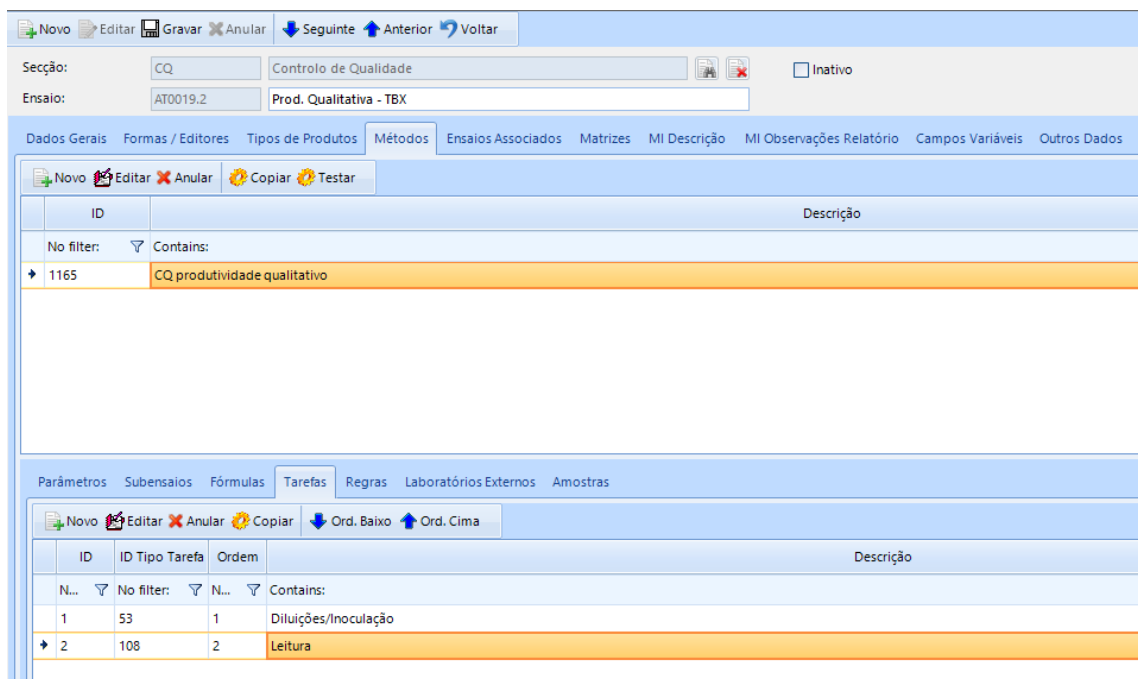


Figura 10 - Exemplo das tarefas configuradas ao método

2.3.1. Métodos do Controlo da Qualidade qualitativo da produtividade

Dentro dos parâmetros revelantes para a análise do CQ dos meios de cultura, carregam-se as diferentes estirpes utilizadas para efetuar a análise, de acordo com a norma 11133:2014. A Figura 11 demonstra os parâmetros carregados para um ensaio do CQ dos meios de cultura.

Está exemplificado o CQ qualitativo da produtividade do TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide agar). É utilizado para enumeração de *E. coli* β -glucuronidase positiva em produtos alimentares. O meio é composto por enzimas digestivas de caseína que vão libertar azoto e carbono necessários para o crescimento bacteriano, sais minerais que vão inibir o crescimento de bactérias gram positivas e um composto cromogénico que vai diferenciar as bactérias β -glucuronidase positivas uma vez que, estas bactérias libertam uma enzima que divide esse composto, libertando um cromóforo colorido que se acumula no interior das células e é possível de ser detetado pelo aparecimento de colónias azuis (VWR chemicals, 2013).

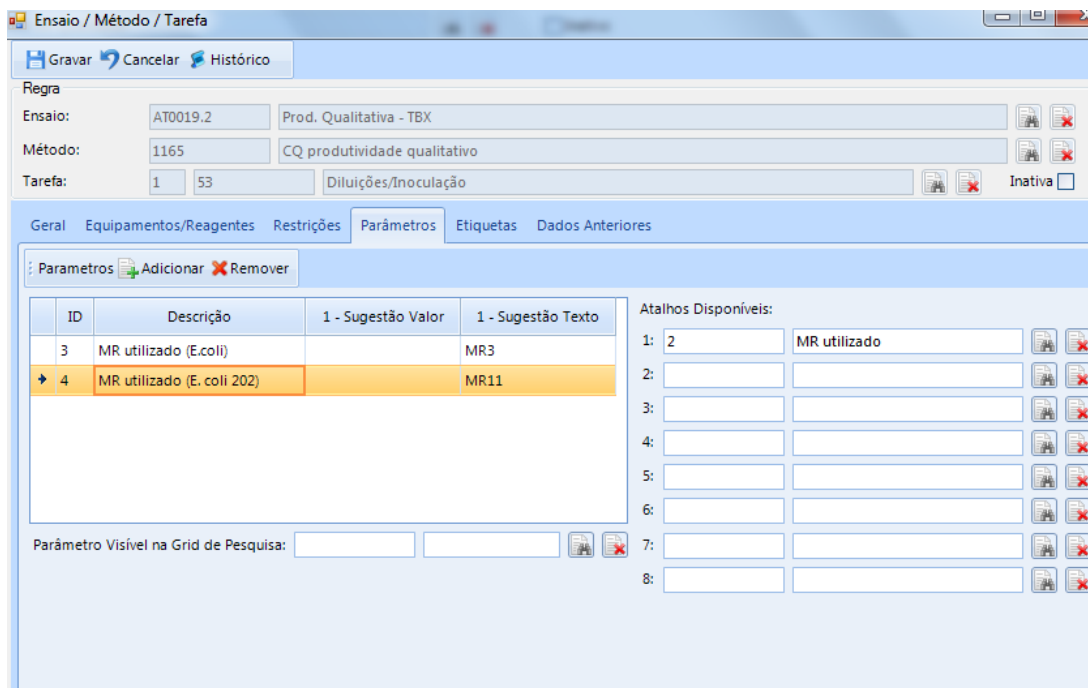


Figura 11- Exemplo do parâmetro carregados para um ensaio do CQ.

Na avaliação qualitativa da produtividade do meio de cultura efetua-se um riscado no meio de cultura em teste, dos diferentes microrganismos referidos na ISO 11133:2014. E segundo a norma, os microrganismos utilizados na avaliação qualitativa do meio é a *Escherichia coli* WDCM 000202 com uma das *Escherichia coli* WDCM 00012 ou *Escherichia coli* WDCM 00013 (ISO11133:2014).

Assim na ferramenta informática é descrito, em sugestão de texto, o material de referência utilizado para esta avaliação qualitativa do desempenho do meio de cultura.

Nesta tarefa, ainda é possível de configurar o equipamento, conforme se demonstra na Figura 12, utilizado na incubação na análise, de acordo a temperatura do meio em teste e com o definido na ISO 11133:2014, permitindo assim uma análise totalmente rastreável.

E no que diz respeito às condições de incubação, a norma 11133:2014, prescreve incubar o meio TBX a 44 ± 1 °C.

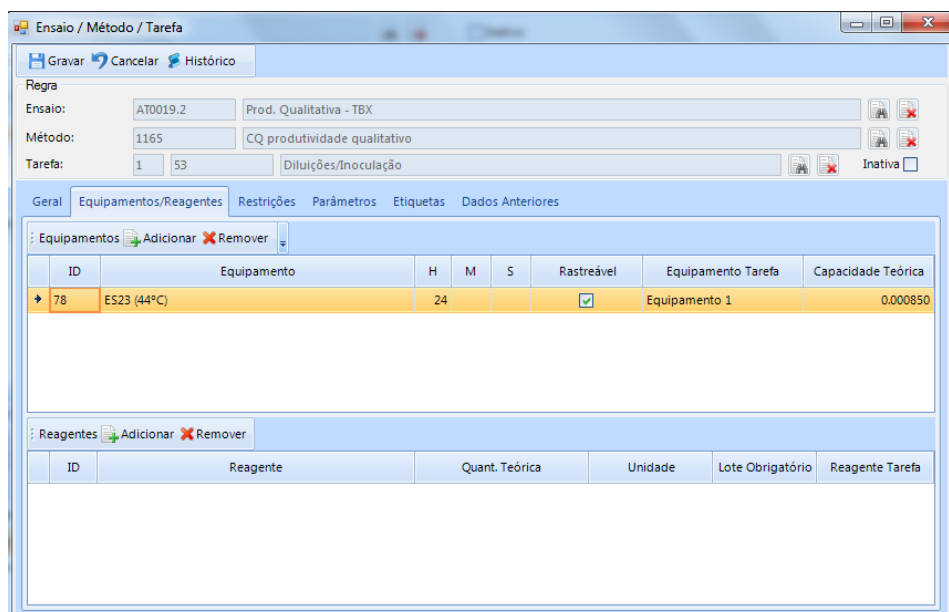


Figura 12-Exemplo da configuração do equipamento utilizado no ensaio do CQ.

O parâmetro da leitura deste ensaio é um parâmetro qualitativo e descritivo, em sugestão de texto, que deve constar uma leitura de acordo com o critério de aceitação definido pela ISO 11133:2014, neste caso, a reação característica esperada são colônias azuis.

Sendo que o meio TBX tem na sua composição um composto cromogénico que vai diferenciar as bactérias β - glucuronidase positivas, como a *Escherichia coli* WDCM 000202, a *Escherichia coli* WDCM 00012 ou a *Escherichia coli* WDCM 00013 uma vez que, estas bactérias libertam uma enzima que divide esse composto, libertando um cromóforo colorido que se acumula no interior das células e é possível de ser detetado pelo aparecimento de colônias azuis (VWR chemicals, 2013).

Assim na Figura 13, está exemplificado a sugestão de texto carregado para o parâmetro da leitura do ensaio do CQ qualitativo da produtividade do TBX.

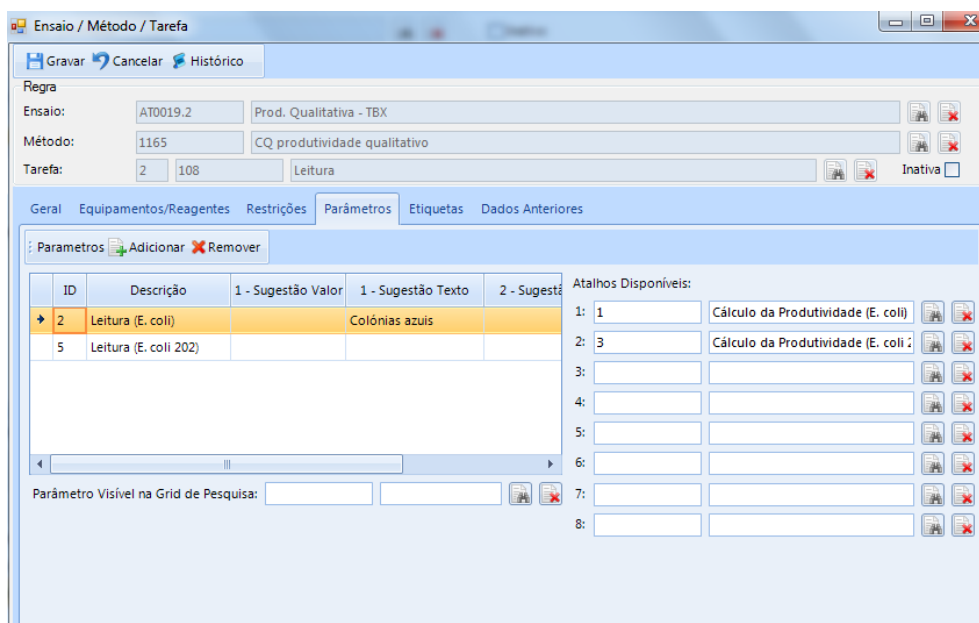


Figura 13- Exemplo do parâmetro da leitura carregado no ensaio do CQ qualitativo da produtividade.

2.3.2. Métodos do Controlo da Qualidade quantitativo da produtividade

Como já referido anterior, no Laboratório realizam-se avaliações quantitativas da produtividade aos meios de cultura que tenham novo lote de fornecedor, aos meios de cultura se destina a ser utilizado noutra Laboratório ou sempre que os meios de cultura que se ultrapassem seis meses após a abertura da embalagem original do produto.

Daí a necessidade de o Laboratório ter um ensaio quantitativo dos meios de cultura que gere a informação de forma automática.

Na Figura 14, apresenta a identificação do ensaio do controlo da qualidade quantitativo da produtividade de um meio de cultura, TBX.

Figura 14- Exemplo do registo de um ensaio do CQ quantitativo da produtividade do TBX.

Os parâmetros relevantes a serem carregados para a análise do CQ quantitativo da produtividade do meio de cultura, estão abaixo apresentados na Figura 15, como o MR, a diluição e o volume utilizado. Sendo estes parâmetros descritivos.

| Descrição | 1 - Sugestão Valor | 1 - Sugestão Texto |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| utilizado (E.coli) | | MR3 |
| uição utilizada (E.coli) | | |
| lume inoculado (E.coli) | | |
| utilizado (E. coli 202) | | MR11 |
| uição utilizada (E. coli 202) | | |
| lume inoculado (E. coli 202) | | |

Figura 15- Exemplo de parâmetros carregados para um CQ quantitativo

Ainda nesta tarefa configura-se o equipamento que se utiliza para a incubação bem como o meio de referência, TSA, definido na norma 11133:2014. Na Figura 16, pode-se verificar a configuração do equipamento e do material de referência. Tornando assim, o CQ um processo rastreável.

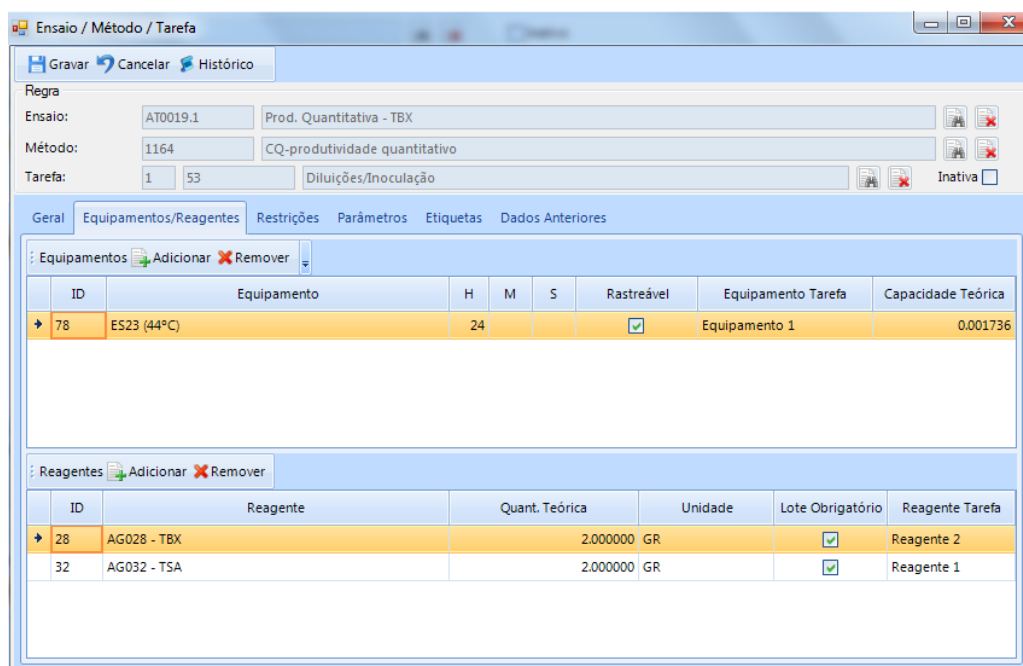


Figura 16- Exemplo da configuração do equipamento e do meio de referência utilizado no ensaio do CQ quantitativo.

A leitura deste ensaio é um parâmetro quantitativo, sendo obtido pela contagem de UFC em placa do meio em teste e do meio em referência.

Na Figura 17, esta representada, em contagem de UFC, o parâmetro da leitura para a método.

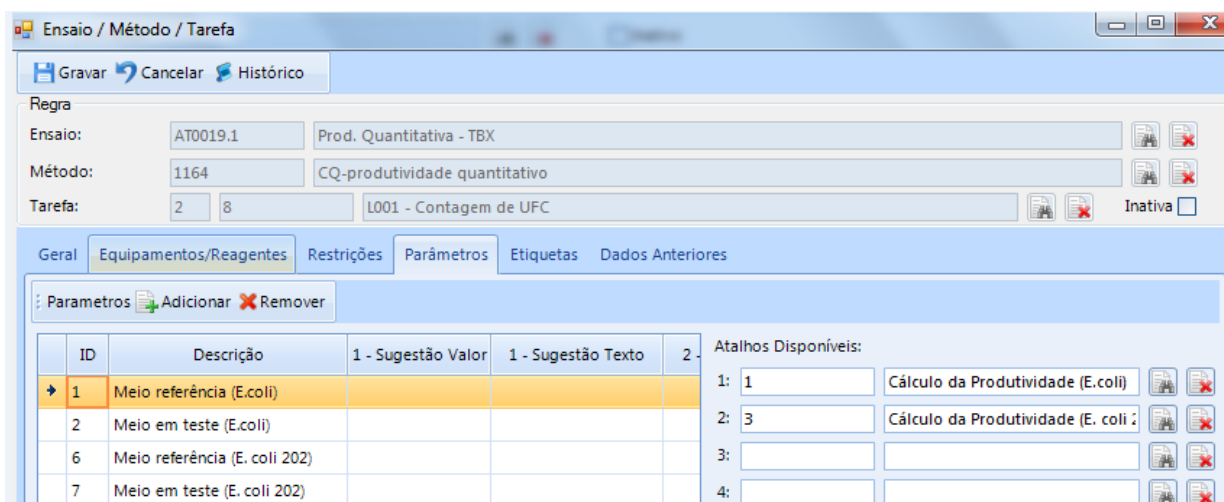


Figura 17- Exemplo do parâmetro da leitura para um CQ quantitativo da produtividade.

O resultado do método do CQ quantitativo da produtividade é dado de acordo com a equação 3 anteriormente apresentada.

No sistema informático o cálculo da produtividade é dado em fórmulas, conforme a Figura 18, de forma que o software calcule automaticamente a produtividade do meio em estudo.

O resultado da produtividade deve estar de acordo com o critério de aceitação, definido pela norma 11133:2014.

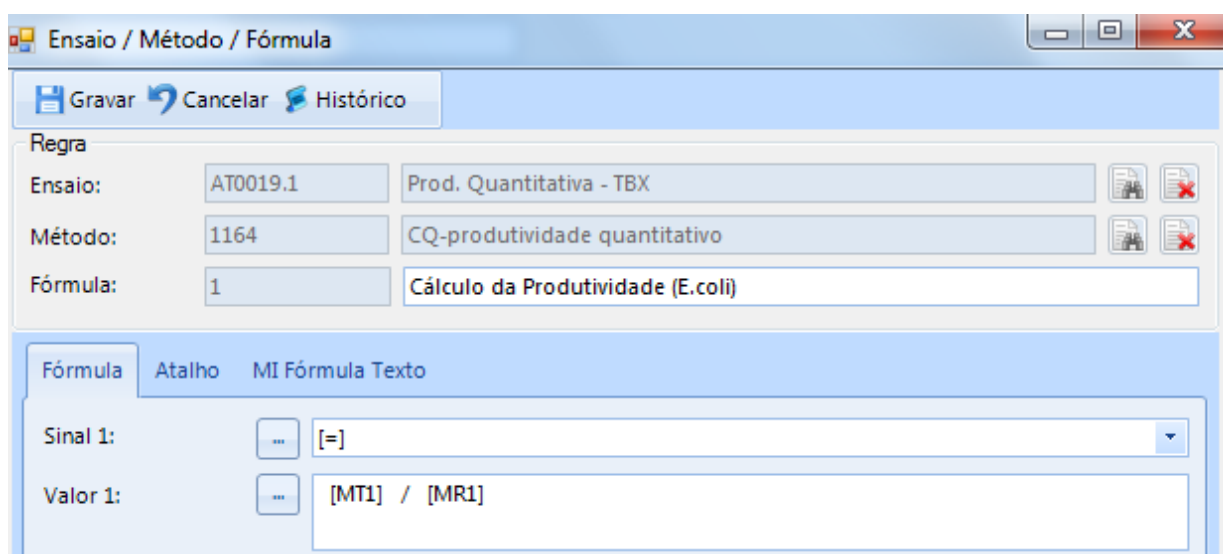


Figura 18- Exemplo das fórmulas carregadas para o cálculo automático do CQ quantitativo da produtividade.

2.3.3. Métodos do Controlo da Qualidade da seletividade

A avaliação da seletividade é definida como o grau de inibição do microrganismo não alvo, sendo uma avaliação qualitativa.

A Figura 19, representa o método do CQ da seletividade do meio de cultura.

The screenshot displays a software interface for recording a quality control (CQ) test. The interface is organized into several sections:

- Top Bar:** Includes navigation buttons: Novo, Editar, Gravar, Anular, Seguinte, Anterior, and Voltar.
- Section Headers:** Secção: CQ (Controlo de Qualidade) and Ensaio: AT0019.3 (Selectividade - TBX). There is an Inativo checkbox.
- Navigation Tabs:** Dados Gerais, Formas / Editores, Tipos de Produtos, Métodos, Ensaios Associados, Matrizes, MI Descrição, MI Observações Relatório, Campos Variáveis, and Outros Dados.
- Main Form Fields:**
 - Método:** 1166, CQ selectividade
 - Laboratório:** TND, Tondela
 - Tipo:** Análise Descritiva (dropdown), Usa Histograma
 - Unidade:** (empty field), Patogénico
 - Fator Diluição (se < > 1):** (empty field), Incluído no Âmbito da Acreditação
 - Subcontratação:** (empty field), Não Reportável
 - Ensaio Associado p/ Estatísticas:** (empty field)
 - Descrição para Estatísticas:** (empty field)
 - Unidade Medida Final:** (empty field)
 - Texto a sugerir no Relatório de Ações Corretivas:** (empty field)
 - Se não Satisfatório:** (empty field)
 - Se Aceitável:** (empty field)
 - Laboratórios Externos:** (empty field)
 - Ensaio Substituto:** (empty field)
 - Área:** Controlo de Qualidade - Microbiologia Tondela
- Right Panel (Apreciação):**
 - Sem Apreciação
 - Manual
 - Automática
 - Tempo previsto (dias):** (empty field)
 - Limite Quantificação Inferior:** (empty field)
 - Limite Quantificação Superior:** (empty field)
 - Preço Base:** (empty field)
 - WebTrieve - Permitir registo de amostras

Figura 19- Exemplo do registo de um ensaio do CQ da seletividade do TBX.

Sendo que a avaliação da seletividade consiste numa avaliação qualitativa, em que os parâmetros das tarefas a ser carregadas, como descrito na Figura 20, são o MR utilizado na avaliação da seletividade, de acordo com o definido na norma 11133:2014, e a respetiva leitura.

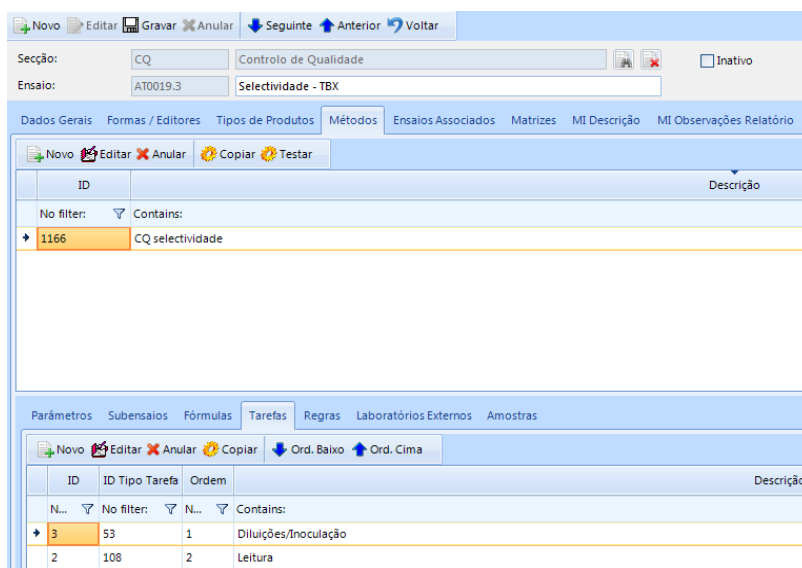
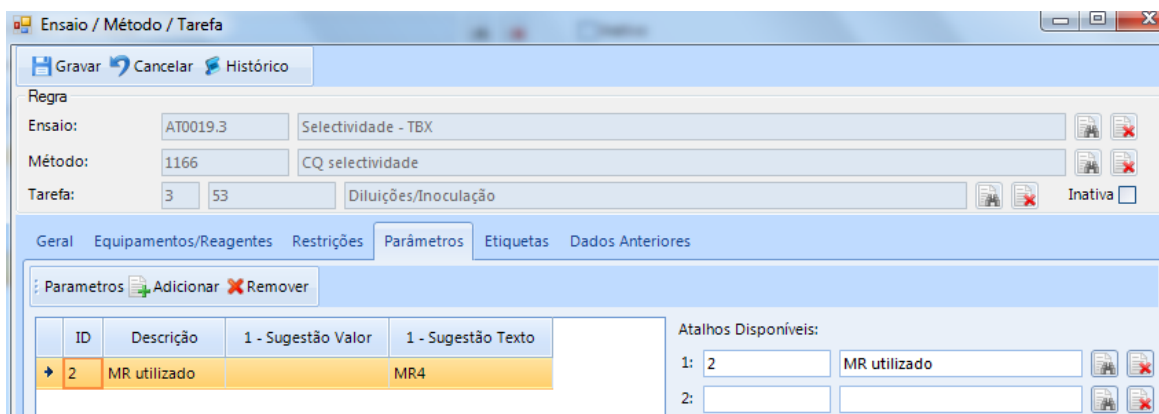


Figura 20- Exemplo de parâmetros carregados para um CQ da seletividade.

Segundo a norma, a estirpe de controlo para a avaliação da seletividade é a *Enterococcus faecalis* WDCM 00009 ou *Enterococcus faecalis* WDCM 00087. E assim, na ferramenta informática é descrito, em sugestão de texto, o material de referência utilizado para esta avaliação da seletividade do desempenho do meio de cultura, conforme na Figura 21 em cima.

Nesta tarefa, também é possível de configurar o equipamento, de acordo a temperatura do meio em teste e com o definido na ISO 11133:2014.

A leitura da avaliação da seletividade é um parâmetro qualitativo e descritivo, em sugestão de texto, e estar de acordo com o critério de aceitação definido pela ISO 11133:2014, neste caso havendo uma inibição total da estirpe de controlo. Na figura 21 em baixo, esta apresentada, a sugestão em texto, do parâmetro da leitura para a avaliação da seletividade dos meios de cultura.



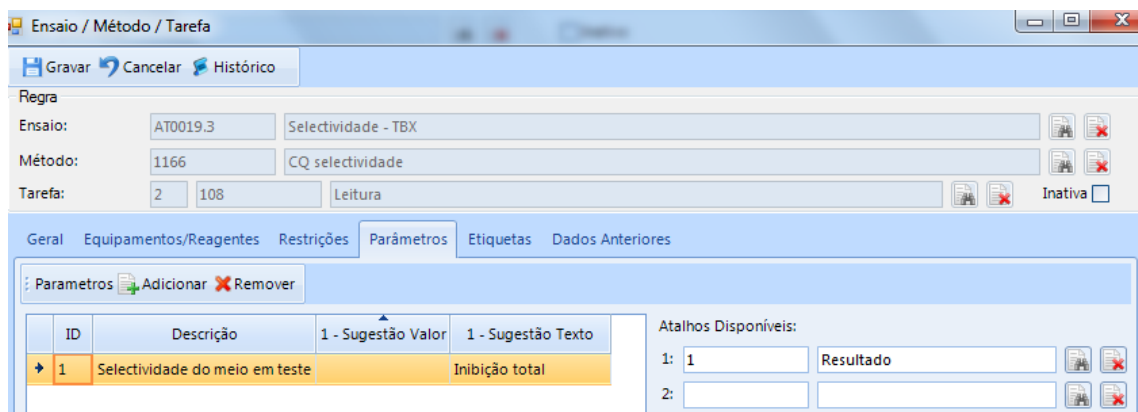


Figura 21– Exemplo do MR carregado (cima) e respetiva leitura do CQ de selectividade do meio de cultura (baixo).

2.3.4. Métodos do Controlo da Qualidade da especificidade

A especificidade é a capacidade de os microrganismos não alvo não serem inibidos, mas apresentarem, no mesmo meio e nas mesmas condições, características visuais diferentes do microrganismo alvo. E sendo uma avaliação qualitativa, o software gerou-se uma análise qualitativa descritiva, conforme a Figura 22.

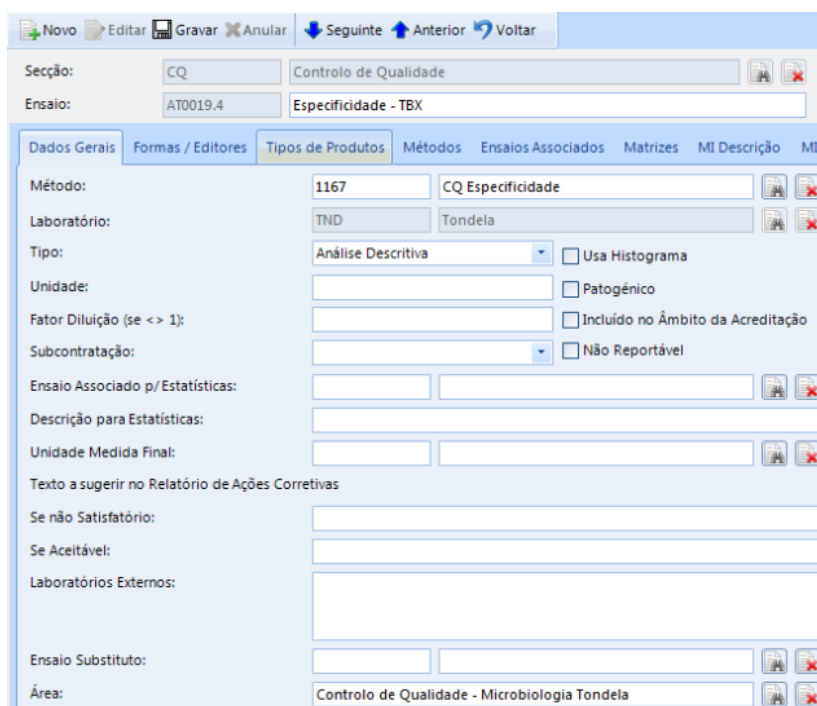


Figura 22- Exemplo do registo de um ensaio do CQ da especificidade do TBX.

De seguida, nestas tarefas são carregados parâmetros como o MR utilizado e a respetiva leitura do método. Segundo, a norma a estripe de controlo utilizada para a avaliação da especificidade é a *Citrobacter freundii* WDCM 00006, a mesma é carregada no software, em sugestão de texto, com exemplificado na Figura 23.

E nunca esquecendo de carregar o devido equipamento, que se utiliza para proceder a incubação.

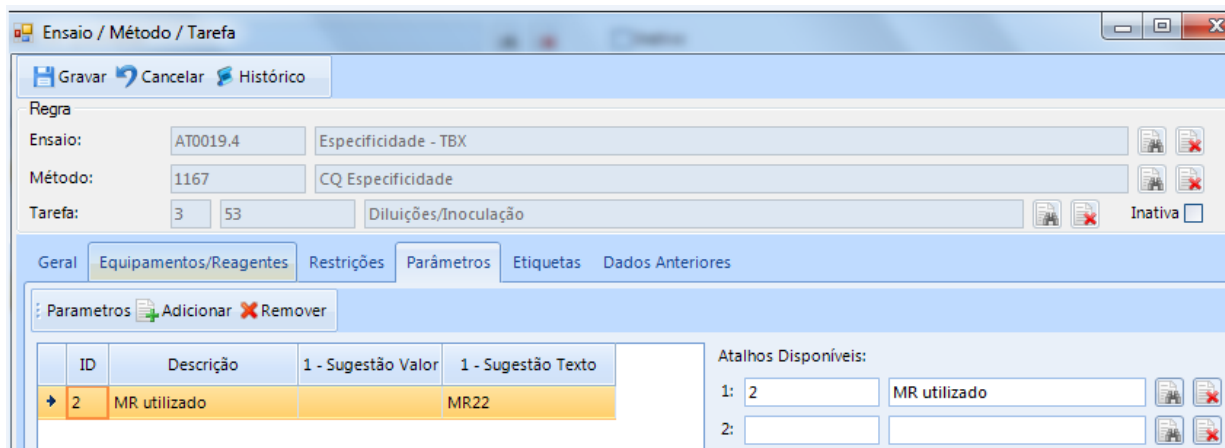


Figura 23- Exemplo do MR carregado no CQ da especificidade do meio de cultura.

Consequentemente, na tarefa da leitura do método carrega-se um parâmetro descritivo com a caracterização da reação esperada do material de referência utilizado na tarefa anterior, o MR 22. Esta descrição deve estar de acordo com o definido da norma 11133:2014.

Na Figura 24, está exemplificado a descrição, em sugestão de texto, do parâmetro da leitura carregado para este método.

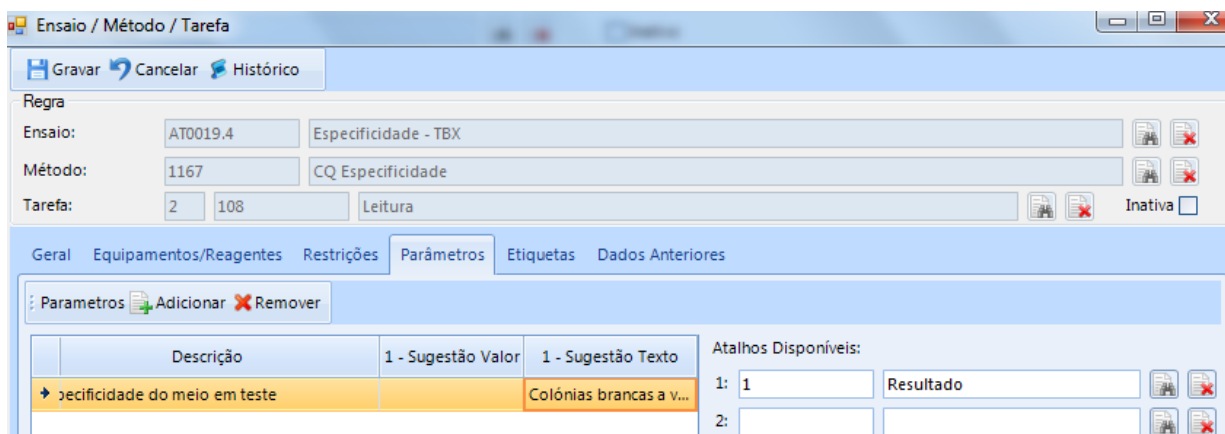


Figura 24- Exemplo do parâmetro da leitura carregado no método do CQ da especificidade.

2.3.5. Métodos do Controlo da Qualidade da esterilidade

Após a preparação do meio de cultura deve-se garantir que os meios de cultura não apresentem qualquer alteração de cor, turvação, depósito, gás ou formação de colónias quando incubadas nas condições de tempo e temperatura recomendadas pelos métodos. Assim, de maneira a evidenciar o CQ da esterilidade dos meios de cultura criou-se um ensaio de esterilidade para os meios de cultura, conforme a Figura 25.

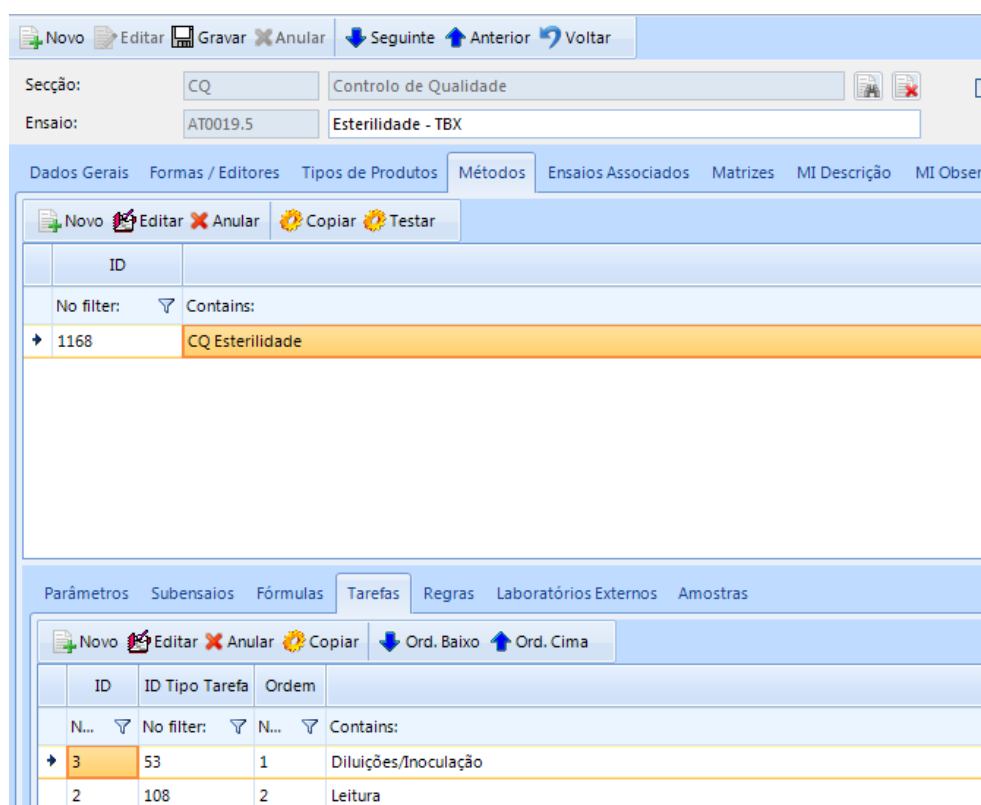


Figura 25- Exemplo de um ensaio de esterilidade para os meios de cultura.

Neste ensaio de esterilidade tem que se configurar o equipamento, de acordo a temperatura do meio em teste ($44\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e com o definido na ISO 11133:2014. De seguida, na incubação, nas condições tempo e temperatura adequada, é possível de observar a reação do meio de cultura, a mesma é carregada no software, de forma descritiva, conforme a Figura 26.

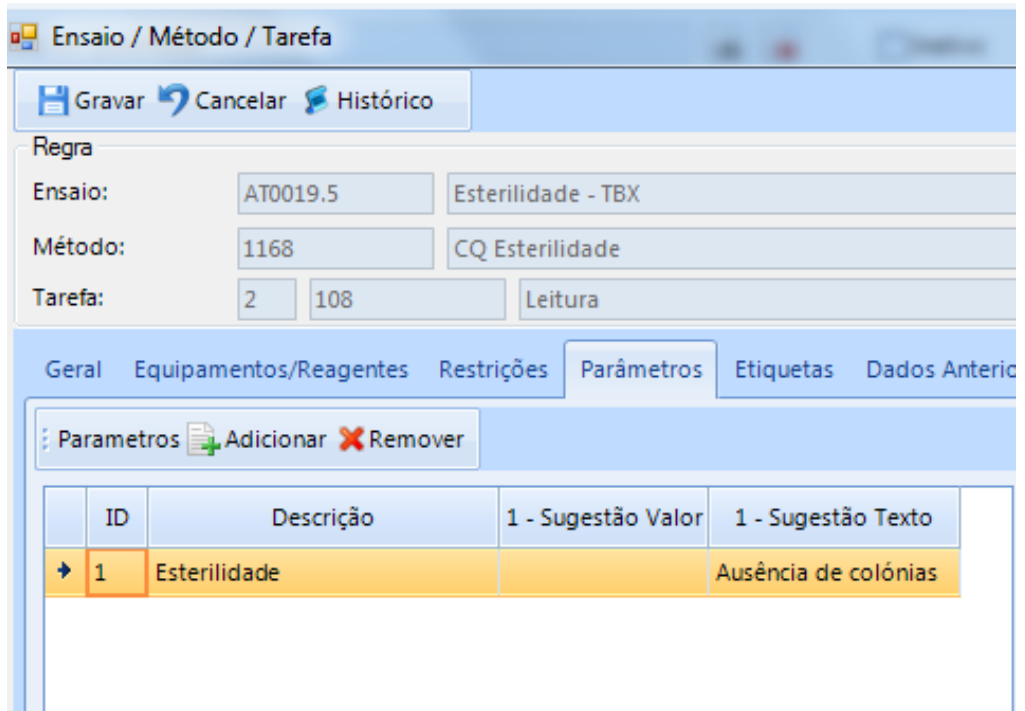


Figura 26- Exemplo do parâmetro da leitura carregado para um método de CQ da esterilidade.

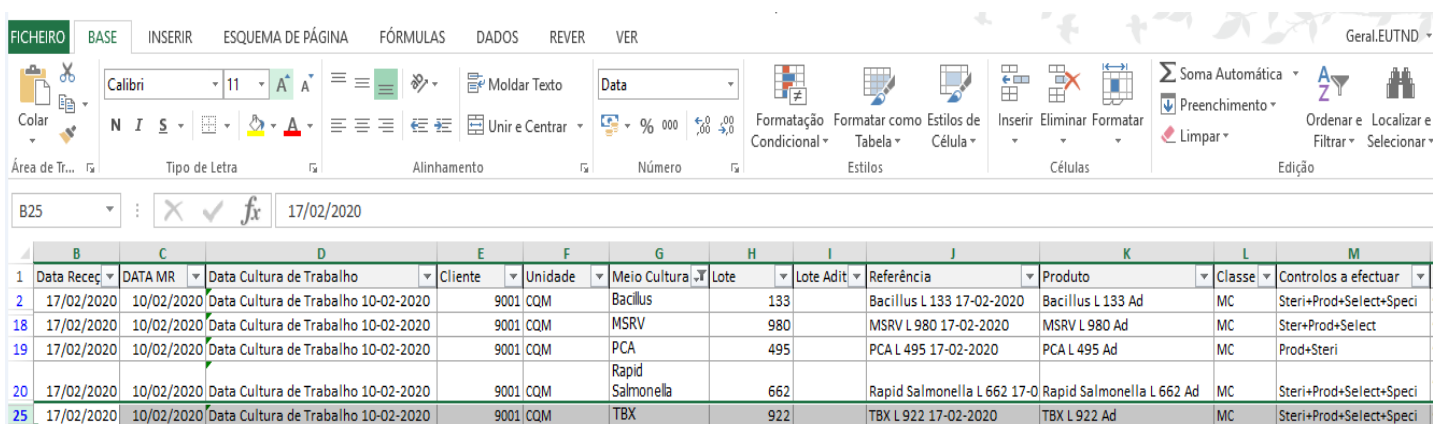
3. A ferramenta informática

A atividade associada à implementação de uma ferramenta informática para o CQ dos meios de cultura inclui diversas etapas e necessitam de serem controladas. Todo este processo envolve tempo, rigor e custos, por isso todas as melhorias que ocorrerem neste processo resultam numa maior fiabilidade e produtividade.

Todas as implementações feitas neste trabalho foram feitas com o intuito de melhor o controlo da qualidade dos meios de cultura.

No que diz respeito à informatização, aplicação “LAB” permitirá o controlo, registo e a organização do CQ dos meios de cultura.

Nas próximas figuras, extraídas da aplicação “LAB” está exemplificado o CQ do TBX devidamente organizado e gerado automaticamente, permitindo assim um processo rápido, eficaz e rastreável do CQ dos meios de cultura do Laboratório. E, posteriormente, seja emitido um certificado de avaliação interna da qualidade dos meios de cultura.



| | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M |
|----|------------|------------|-------------------------------------|---------|---------|------------------|------|-----------|-----------------------------|---------------------------|--------|-------------------------|
| 1 | Data Receç | DATA MR | Data Cultura de Trabalho | Cliente | Unidade | Meio Cultura | Lote | Lote Adit | Referência | Produto | Classe | Controlos a efectuar |
| 2 | 17/02/2020 | 10/02/2020 | Data Cultura de Trabalho 10-02-2020 | 9001 | CQM | Bacillus | 133 | | Bacillus L 133 17-02-2020 | Bacillus L 133 Ad | MC | Steri+Prod>Select+Speci |
| 18 | 17/02/2020 | 10/02/2020 | Data Cultura de Trabalho 10-02-2020 | 9001 | CQM | MSRV | 980 | | MSRV L 980 17-02-2020 | MSRV L 980 Ad | MC | Steri+Prod>Select |
| 19 | 17/02/2020 | 10/02/2020 | Data Cultura de Trabalho 10-02-2020 | 9001 | CQM | PCA | 495 | | PCA L 495 17-02-2020 | PCA L 495 Ad | MC | Prod+Steri |
| 20 | 17/02/2020 | 10/02/2020 | Data Cultura de Trabalho 10-02-2020 | 9001 | CQM | Rapid Salmonella | 662 | | Rapid Salmonella L 662 17-0 | Rapid Salmonella L 662 Ad | MC | Steri+Prod>Select+Speci |
| 25 | 17/02/2020 | 10/02/2020 | Data Cultura de Trabalho 10-02-2020 | 9001 | CQM | TBX | 922 | | TBX L 922 17-02-2020 | TBX L 922 Ad | MC | Steri+Prod>Select+Speci |

Figura 27- Exemplo do template organizado e completo.

Ao fim do template estar completamente e devidamente preenchido, conforme a Figura 27, os dados são importados para o software “LAB”. Onde são geradas, automaticamente, análises correspondentes ao CQ do meio de cultura.

Na Figura 28, está representado uma parte da aplicação “LAB” onde é perceptível que a cada meio de cultura controlado está associado, automaticamente, um número de análise e as respetivas tarefas carregadas.

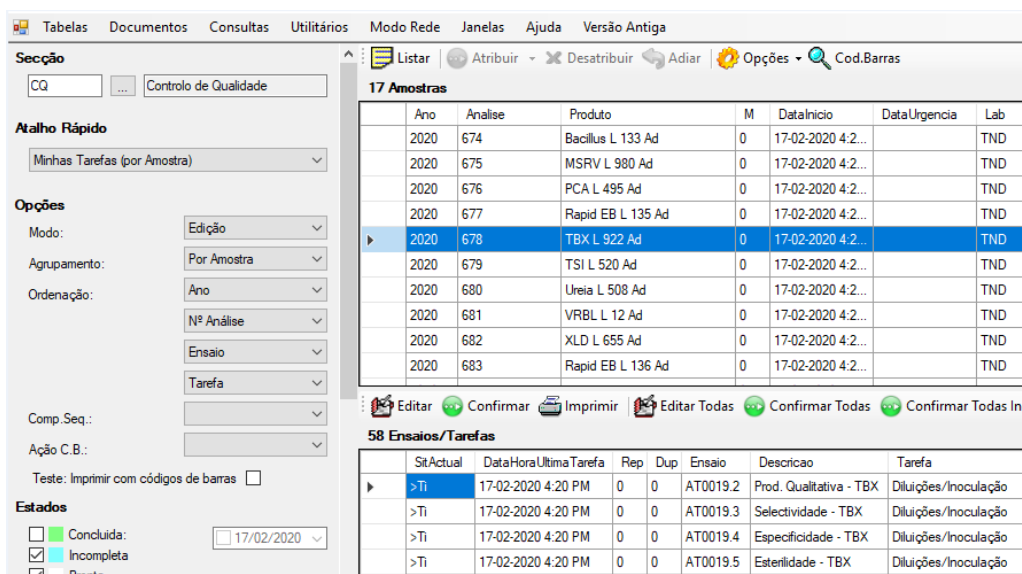


Figura 28- Parte da aplicação “LAB”, onde o CQ já está gerado e carregado.

Sempre que se confirma um ensaio de CQ o software é capaz de ir buscar, automaticamente, o material de referência utilizado para cada meio de cultura e associa também o equipamento no qual se deve proceder à incubação. Na Figura 29, está exemplificado o CQ qualitativo da produtividade do TBX.

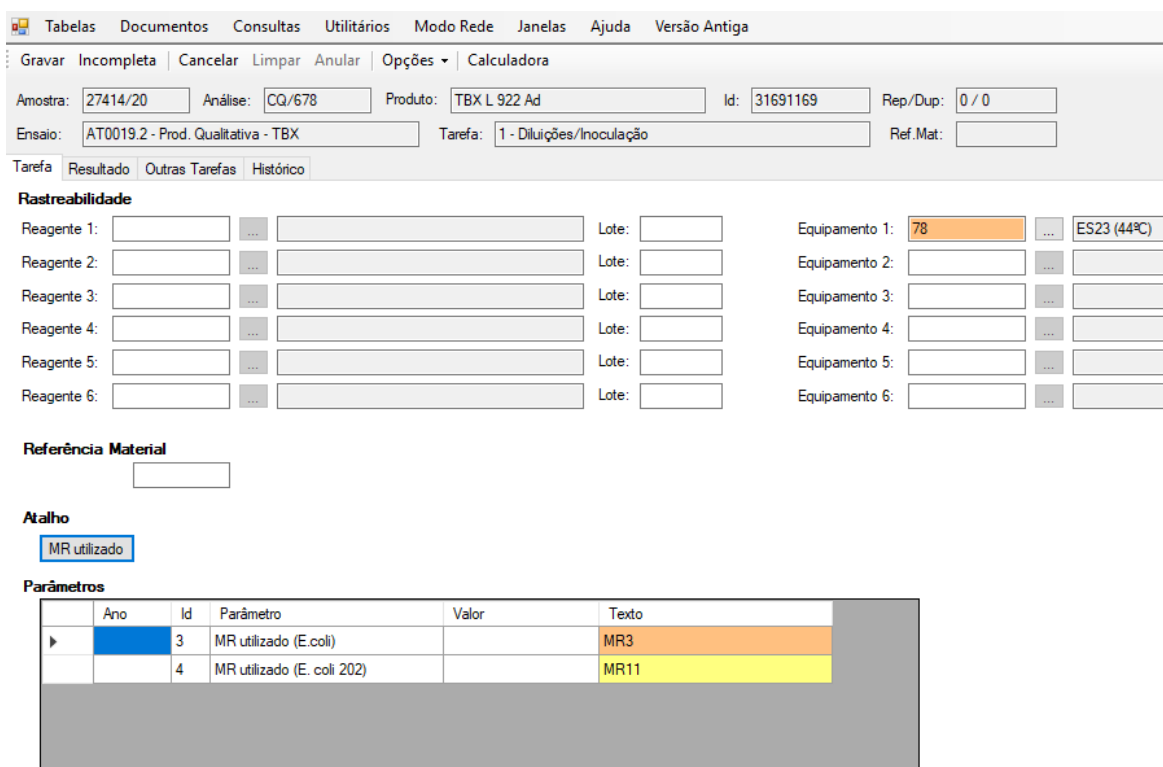


Figura 29- Parâmetro do MR utilizado carregado automaticamente.

Na Figura 30, abaixo apresentada, demonstra a funcionalidade do software em gerar a informação de forma automática, dos parâmetros carregados anteriormente.

Editar Tarefa

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 3947/20 Análise: CQ/173 Produto: TBX L 915 Ad

Ensaio: AT0019.2 - Prod. Qualitativa - TBX Tarefa: 2 - Leitura

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

Reagente 1: ... Lote:

Reagente 2: ... Lote:

Reagente 3: ... Lote:

Reagente 4: ... Lote:

Reagente 5: ... Lote:

Reagente 6: ... Lote:

Referência Material

Atalho

Cálculo da Produtividade (E. coli) Cálculo da Produtividade (E. coli 202)

Parâmetros

| | Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|--|------|----|-----------------------|-------|----------------|
| | 2020 | 2 | Leitura (E. coli) | | Colônias azuis |
| | 2020 | 5 | Leitura (E. coli 202) | | Colônias azuis |

Resultado

Figura 30- Parâmetros da leitura carregados automaticamente.

Na seletividade, a estirpe de controlo e o equipamento já estão configurados para os meios de cultura, assim como a leitura da avaliação da seletividade. Na Figura 31, demonstrar a funcionalidade do software na avaliação da seletividade.

Tabelas Documentos Consultas Utilitários Modo Rede Janelas Ajuda Versão Antiga

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 27414/20 Análise: CQ/678 Produto: TBX L 922 Ad Id: 31691171 Rep/Dup: 0 / 0

Ensaio: AT0019.3 - Selectividade - TBX Tarefa: 1 - Diluições/Inoculação Ref.Mat:

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

Reagente 1: [] Lote: [] Equipamento 1: 78 ES23 (44°C)

Reagente 2: [] Lote: [] Equipamento 2: []

Reagente 3: [] Lote: [] Equipamento 3: []

Reagente 4: [] Lote: [] Equipamento 4: []

Reagente 5: [] Lote: [] Equipamento 5: []

Reagente 6: [] Lote: [] Equipamento 6: []

Referência Material

[]

Atalho

MR utilizado

Parâmetros

| Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|-----|----|--------------|-------|-------|
| | 2 | MR utilizado | | MR4 |

Editar Tarefa

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 3947/20 Análise: CQ/173 Produto: TBX L 915 Ad Id: 31250086 Rep/Dup: 0 / 0

Ensaio: AT0019.3 - Selectividade - TBX Tarefa: 2 - Leitura Ref.Mat:

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

Reagente 1: [] Lote: [] Equipamento 1: []

Reagente 2: [] Lote: [] Equipamento 2: []

Reagente 3: [] Lote: [] Equipamento 3: []

Reagente 4: [] Lote: [] Equipamento 4: []

Reagente 5: [] Lote: [] Equipamento 5: []

Reagente 6: [] Lote: [] Equipamento 6: []

Referência Material

[]

Atalho

Resultado

Parâmetros

| Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|------|----|--------------------------------|-------|----------------|
| 2020 | 1 | Selectividade do meio em teste | | Inibição total |

Opções Laboratório: TND

Data/Hora: 11-01-2020 12:29

Anular Operações Seguintes

Observações Tarefa

[]

Observações Análise

[]

Figura 31- Parâmetros carregados automaticamente para ensaio de CQ da seletividade.

Na especificidade, a estirpe de controlo e o equipamento já estão carregados de forma automática para os meios de cultura, assim como a leitura da avaliação da especificidade. A Figura 32, demonstrar a funcionalidade do software na avaliação da especificidade.

Tabelas Documentos Consultas Utilitários Modo Rede Janelas Ajuda Versão Antiga

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 27414/20 Análise: CQ/678 Produto: TBX L 922 Ad Id: 31691173 Rep/Dup: 0 / 0

Ensaio: AT0019.4 - Especificidade - TBX Tarefa: 1 - Diluições/Inoculação Ref.Mat:

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

Reagente 1: Lote: Equipamento 1: 78 ES23 (44°C)

Reagente 2: Lote: Equipamento 2:

Reagente 3: Lote: Equipamento 3:

Reagente 4: Lote: Equipamento 4:

Reagente 5: Lote: Equipamento 5:

Reagente 6: Lote: Equipamento 6:

Referência Material

Atalho

MR utilizado

Parâmetros

| Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|------|----|--------------|-------|-------|
| 2020 | 2 | MR utilizado | | MR22 |

Editar Tarefa

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 3947/20 Análise: CQ/173 Produto: TBX L 915 Ad Id: 31250088

Ensaio: AT0019.4 - Especificidade - TBX Tarefa: 3 - Leitura

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

Reagente 1: Lote: Equipamento

Reagente 2: Lote: Equipamento

Reagente 3: Lote: Equipamento

Reagente 4: Lote: Equipamento

Reagente 5: Lote: Equipamento

Reagente 6: Lote: Equipamento

Referência Material

Atalho

Resultado

Parâmetros

| Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|------|----|---------------------------------|-------|-------------------------------|
| 2020 | 1 | Especificidade do meio em teste | | Colônias brancas a verde/bege |

Figura 32- Parâmetros carregados automaticamente para ensaio de CQ da especificidade.

Obtida a informação de forma automática e organizada no software, torna-se mais prático e eficaz o processo de avaliação do controlo da qualidade dos meios de cultura.

Na Figura 33, está exemplificado a avaliação de desempenho do TBX. Observa-se uma placa de 90 mm com meio TBX, devidamente dividida e com o riscado das diferentes estirpes de controlo para cada avaliação do CQ. Ou seja, para o CQ qualitativo da produtividade, utilizam-se as estirpes *Escherichia coli* WDCM 000202 com a *Escherichia coli* WDCM 00012 (MR 3 e MR 11), em que a reação esperada são as colónias azuis.

Na avaliação da seletividade utiliza-se o *Enterococcus faecalis* WDCM 00087 (MR 4), o qual é totalmente inibido no meio em teste.

Na seletividade a estirpe de controlo é *Citrobacter freundii* WDCM 00006 (MR 22), esperando assim colónias brancas ou bege, conforme na figura.

A implementação de ferramenta informática permitiu assim, uma melhor compreensão e organização das estirpes de controlo a serem utilizadas na avaliação dos meios de cultura, tornando o processo mais rápido.



Figura 33- Avaliação do desempenho do meio TBX

O controlo da qualidade quantitativo que tende a ser uma avaliação mais complexa do meio de cultura, através das configurações feitas anteriormente explicadas no software, conseguiu-se simplificar o processo analítico do mesmo, como exemplificado na Figura 34.

O software foi configurado com o material de referência e o equipamento a utilizar na avaliação quantitativa. Ficando por preencher, manualmente, o volume e a diluição a utilizar, sendo que estes parâmetros variam consoante o comportamento das estirpes, estudado previamente. Também são inseridos os lotes, do meio em teste e do meio de referência, permitindo assim um processo analítico rastreável.

Gravar Incompleta Cancelar Limpar Anular Opções Calculadora

Amostra: 117370/19 Análise: CQ/2904 Produto: TBX L 872 Ad lote fomecedor 6426413l Id: 29167898 Rep/Dup: 0 / 0

Ensaio: AT0019.1 - Prod. Quantitativa - TBX Tarefa: 1 - Diluições/Inoculação Ref.Mat:

Tarefa Resultado Outras Tarefas Histórico

Rastreabilidade

| | | | | | | |
|-------------|----|-------------|-----------|----------------|----|-------------|
| Reagente 1: | 32 | AG032 - TSA | Lote: 542 | Equipamento 1: | 78 | ES23 (44°C) |
| Reagente 2: | 28 | AG028 - TBX | Lote: 872 | Equipamento 2: | | |
| Reagente 3: | | | Lote: | Equipamento 3: | | |
| Reagente 4: | | | Lote: | Equipamento 4: | | |
| Reagente 5: | | | Lote: | Equipamento 5: | | |
| Reagente 6: | | | Lote: | Equipamento 6: | | |

Referência Material

MR utilizado

Atalho

MR utilizado

Parâmetros

| Ano | Id | Parâmetro | Valor | Texto |
|------|----|----------------------------------|-------|-------|
| 2019 | 3 | MR utilizado (E.coli) | | MR3 |
| 2019 | 4 | Diluição utilizada (E.coli) | | D-7 |
| 2019 | 5 | Volume inoculado (E.coli) | | 0.1 |
| 2019 | 8 | MR utilizado (E. coli 202) | | MR11 |
| 2019 | 9 | Diluição utilizada (E. coli 202) | | D-7 |
| 2019 | 10 | Volume inoculado (E. coli 202) | | 0.1 |

Figura 34 - Exemplo da configuração do software para um CQ quantitativo.

Consequente, à tarefa anterior, a leitura é dada pela contagem de UFC e inserida no software.

O software calcule automaticamente o resultado da produtividade do meio em estudo, segundo a expressão apresentada na equação 1.

A Figura 35, demonstra a funcionalidade do software aplicado a uma avaliação quantitativa de um meio de cultura.

The screenshot shows the 'Editar Tarefa' window with the following data:

Amostra: 117370/19 | Análise: CQ/2904 | Produto: TBX L 872 Ad lote fomecedor 6426413l | Id: 29167899 | Rep/Dup: 0 / 0

Ensaio: AT0019.1 - Prod. Quantitativa - TBX | Tarefa: 2 - L001 - Contagem de UFC | Ref.Mat:

Sub-Ensaio Table:

| Estado | Id | SubEnsaio | Resultado | Unid.Base | Unid.Final | Apr | CondicaoS |
|--------|----|-------------|-----------|-----------|------------|-----|-----------|
| ▶ | 1 | E.coli | 1.06 | . | . | | |
| | 1 | E. coli 202 | 1.04 | . | . | | |

Parâmetros Table:

| Id | Sigla | SubEnsaio | Parâmetro | Valor | Texto | Observações |
|----|---------|-----------|--------------------------|-------|-------|-------------|
| 1 | MR1 | | Meio referência (E... | 109 | | |
| 2 | MT1 | | Meio em teste (E.c... | 116 | | |
| 3 | MR... | | MR utilizado (E.coli) | | MR3 | |
| 4 | Dil1 | | Diluição utilizada (...) | | D-7 | |
| 5 | V.in... | | Volume inoculado... | | 0,1 | |
| 6 | MR2 | | Meio referência (E... | 120 | | |
| 7 | MT2 | | Meio em teste (E... | 125 | | |
| 8 | MR... | | MR utilizado (E. co... | | MR11 | |
| 9 | Dil2 | | Diluição utilizada (...) | | D-7 | |
| 10 | V.in... | | Volume inoculado... | | 0,1 | |

Figura 35-Exemplo do resultado de produtividade para uma avaliação quantitativa.

A implementação desta ferramenta informática permitiu uma melhor organização do controlo da qualidade do meio de cultura, como se apresenta na Figura 36, podendo assim, migrar a informação para um certificado de avaliação interna da qualidade dos meios de cultura, caso esta esteja de acordo com os critérios de aceitação da norma 11133:2014.

Ainda, os resultados da produtividade dos meios de cultura são introduzidos numa carta de controlo (carta de produtividade), o que permite saber se o meio ainda é adequado para a realização dos ensaios analíticos do Laboratório.

Documento

Ano: 2020

Nº Amostra:

Análise:

Origem:

Posto:

Nº Amostra:

Nº Doc. Integração:

Visita:

Cod Barras:

Dados da amostra

Cliente:

Unidade:

Produto: **Tbx**

Referência:

Data Receção: 26/03/2020 a 26/03/2020

WT Work Order Nº:

WT Sample Nº:

Ano Completas

Ano Incompletas

Data Urgência Preenchida

Últimas 100 amostras

Laboratório

TND Tondela

Todos

Amostras Análises Relatórios

| Sel | Ano | NumAmostra | RegAmostra | DataRecepcao | DataInicio | Produto | Qual | Entrega | Cliente | NomeCliente |
|-------------------------------------|------|------------|------------|----------------|-----------------|--------------|------|---------|---------|----------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2020 | 47275 | CQ / 1167 | 20-03-2020 | 20-03-2020 12: | TBX L 930 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 44434 | CQ / 1089 | 14-03-2020 | 14-03-2020 3.2: | TBX L 929 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 42041 | CQ / 1028 | 12-03-2020 | 12-03-2020 10: | TBX L 928 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 39887 | CQ / 1004 | 10-03-2020 | 10-03-2020 10: | TBX L 927 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 36196 | CQ / 930 | 04-03-2020 11: | 04-03-2020 11: | TBX L 925 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 33998 | CQ / 848 | 28-02-2020 | 28-02-2020 11: | TBX L 925 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 33158 | CQ / 842 | 27-02-2020 | 27-02-2020 11: | TBX L 924 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 32909 | CQ / 794 | 26-02-2020 | 26-02-2020 8.4: | TBX L 924 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 30305 | CQ / 719 | 20-02-2020 | 20-02-2020 6.0: | TBX L 923 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 27414 | CQ / 678 | 17-02-2020 | 17-02-2020 4.2: | TBX L 922 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |
| <input type="checkbox"/> | 2020 | 23512 | CQ / 610 | 12-02-2020 | 12-02-2020 10: | TBX L 921 Ad | 1 | | 9001 | Controlvet, Seguranç |

Figura 36- Análises do controlo de qualidade do meio TBX.

Assim, no software quando se pesquisa as análises efetuadas ao controlo de qualidade do meio de cultura, TBX, o sistema informático permite a visualização de todos os controlos da qualidade realizados ao meio de cultura como é possível de observar na Figura 36. É notório que para cada lote interno atribuído ao meio de cultura o controlo da qualidade é realizado.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho surgiu da necessidade de clarificar e melhorar o controlo da qualidade dos meios de cultura e os processos associados à sua gestão no laboratório de microbiologia da ALS Controlvet. A implementação de um sistema de CQ, permite garantir a qualidade no laboratório, reduzindo os erros de execução de análises, aumento da confiança e credibilidade do laboratório.

Estando integrada no grupo ALS Controlvet, quero salientar que os resultados obtidos neste projeto se devem a um trabalho de equipa, que estando centrado em mim, envolveu também o Laboratório, o departamento da Qualidade e da Informática, quer por desenvolvimento do software, troca de ideias, sugestões ou até correções, todos estão incluídos neste trabalho.

No sentido de promover uma melhoria continua no CQ, aperfeiçoou-se o processo analítico do CQ dos meios de cultura.

No que diz respeito à informatização, a partir de uma aplicação informática no “LAB “que gere a informação de forma automática e o processo analítico do CQ tornou-se mais eficaz e rastreável.

A nível pessoal, este projeto foi muito enriquecedor, pois permitiu-me ter uma perspetiva diferente no que diz respeito ao controlo da qualidade dos meios de cultura, atribuir-lhe maior relevância, que por vezes é negligenciada durante o controlo da qualidade. A nível técnico considero que adquiri conhecimentos úteis, que já pude pôr em prática, de novas metodologias de controlo, normas de referência, procedimentos de sistema de gestão e metodologias de investigação.

Para a ALS Controlvet este projeto vai favorecer a organização ao nível de planeamento, ordem de trabalho, gestão de tempo, uma vez que o software faz grande parte do trabalho, quer ao nível o controlo de qualidade dos meios de cultura.

No geral, trata-se de uma mais-valia para a empresa, uma vez que o tempo e os custos despendidos no desenvolvimento do projeto terão benefícios a longo prazo, quer pela automatização do processo, controlo da qualidade dos resultados mais confiáveis, assim como pelo potencial que o software pode ter, se for aplicado noutros Laboratórios.

O objetivo deste trabalho ficou concluído, uma vez que está operacional. Foram feitos todos os esforços, no entanto, é um processo que necessita de desenvolvimento e depende de terceiros, não se teria conseguido que ficasse totalmente concluído até

à data. O software já está criado, já permite criar e adicionar o controlo da qualidade aos meios de cultura, contudo necessita de alterações e mais desenvolvimentos, que se detetaram durante a fase de teste.

Apesar de estar concluído elaborou-se um novo plano para o futuro com o objetivo de migrar toda esta informação do software para um certificado informático de avaliação interna da qualidade dos meios de cultura. Este é um projeto a longo prazo e o meu compromisso com a empresa permitirá que possa acompanhar o projeto até o software estar completamente desenvolvido e operacional nesse sentido.

Quando o software estiver em funcionamento, surgirão novos desafios, novas dificuldades, sugestões de melhoria, pois este é um percurso dinâmico em constante evolução.

Como desenvolvimentos futuros do presente trabalho, prevê-se a expansão e aplicação do software, pela automatização do processo, controlo da qualidade dos resultados mais confiáveis, assim como pelo potencial que o software pode ter, se for aplicado noutros Laboratórios.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, J. S., & Pires, A. C. (2006). Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e /ou calibração. Química, pág.34 - pág.39. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/626/article/30001307/pdf>.

António NS, Teixeira A, Rosa A (2016). Gestão da Qualidade – de Deming ao Modelo de Excelência da EFQM (2ª Edição). Lisboa, Edições Sílabo: 13, 32-33.

ALS Portugal, disponível em : <https://www.alsglobal.pt/sobre-als/quality>.

Biokar (2020). TBX agar. Consultado a 26 de Março, disponível em: <http://www.dongnamlab.com/chromogenic-culture-media-400/bk146ha-tbx-agar-905>

Gerten, B. (2014). Lab Implementation of ISO 11133:2014. Consultado a 29 Janeiro, disponível em <http://www.foodqualityandsafety.com/article/lab-implementation-of-iso-111332014/>

IPQ - Instituto Português da Qualidade) (2005). Norma Portuguesa - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005).

IPQ - Instituto Português da Qualidade) (2015). Módulo 1 - O que são Normas e o que é a Normalização?

IPQ - Instituto Português da Qualidade) (2017). Normalização. Consultado a 3 Janeiro, disponível em <http://www1.ipq.pt/PT/Normalizacao/Pages/Normalizacao.aspx>

IPAC - Instituto Português da Acreditação) (2017). A Acreditação. Consultado a 3 Janeiro, disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>

ISO - International Organization of Standardization (2017). All about ISO. Consultado a 3 janeiro, disponível em: <https://www.iso.org/about-us.html>

ISO - International Organization of Standardization (2018). ISO 8199 - Water quality — General requirements and guidance for microbiological examinations by culture.

ISO - International Organization of Standardization (2014). ISO 11133 - Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

ISO - International Organization of Standardization (2017). ISO 6887-1: Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

ISO - International Organization of Standardization (2015). ISO 9001- Quality management systems — Requirements

ISO - International Organization of Standardization (2015). ISO 7704 -Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.

ISO - International Organization of Standardization (2019). ISO 19036
Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

IEC - International Electrotechnical Organization) (2017). About the IEC. Retrieved May 28, 2017, from <http://www.iec.ch/about/?ref=menu>.

Lightfoot, N. F. & Maier, E.A. (1998). Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance. Amsterdam: Elsevier.

Machado, J., & Almeida, M. (2013). Análise do Processo de Implementação do Sistema de Gestão da Qualidade em um Laboratório de Ensaios Conforme a MBR ISO/IEC 17025:2005 e a sua Importância na Prestação de Serviços a Órgãos Públicos. Revista Iniciação Científica, 11, 50–64.

RELACRE. (2007). Acreditação de Laboratórios de Ensaios Microbiológicos. (RELACRE, Ed.) (2a).

Sampaio, C. (2016, June). Validação de meios de cultura utilizados em análises microbiológicas de alimentos. ResearchGate, (June 2006), 47. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2016.9126>

VWR Chemicals. (2013). Tryptone bile x-glucuronidase agar - TBX (ISO). Retrieved May 27, 2017, from https://pt.vwr.com/assetsvc/asset/pt_PT/id/11776048/contents

VII. ANEXOS

ANEXO A- Critérios dos testes de desempenho dos meios de cultura

| Meio de Cultura | Tipo de Meio | Microrganismos | Norma Internacional | Tipo de Teste | Incubação | Estirpes de controlo | Número WDCM* | Meio de Referência | Natureza do Método | Critério | Características |
|-----------------|--------------|--|---------------------|----------------|--|---|---|--|--------------------|---------------------|--|
| Baird-Parker | S | Estafilococos coagulase-positiva | ISO 6888-1 | Produtividade | (24 ± 2) h to (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C | <i>Staphylococcus aureus</i> | 00034 00032 | TSA | Quantitativo | PR ≥ 0,5 | Colónias pretas a cinza com a preseça de halo claro. |
| | | | | Seletividade | (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C | <i>Escherichia coli</i> | 00012 00013 | - | Qualitativo | Total inibição (0) | - |
| | | | | Especificidade | (24 ± 2) h to (48 ± 2) h/ (37 ± 1) °C | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 00159 00036 | - | Qualitativo | - | Colónias pretas a cinza sem a preseça de halo. |
| Lactose TTC | S | <i>Escherichia coli</i> / bactérias coliformes | ISO 9308-1 | Produtividade | (21 ± 3) h/ (36 ± 2) °C | <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Citrobacter freundii</i> | 00179 00012 00013 00175 00006 | Meio Lactose TTC anteriormente validado. | Quantitativo | PR ≥ 0,7 | Colónias amarelas na membrana filtrante. |
| | | | | Seletividade | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 00009 ou 00087 | - | Qualitativo | Total inibição (0) | - |
| | | | | Especificidade | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 00025 ou 00026 | - | Qualitativo | - | Colónias vermelhas com o meio azul |
| TBX | S | <i>Escherichia coli</i> β-D-Glucuronidase-positiva | ISO 16649-3 | Produtividade | (21 ± 3) h/ (44 ± 1) °C | <i>Escherichia coli</i> | 00012 00013 00202 | - | Qualitativo | Bom Crescimento (2) | Colónias azuis |
| | | | | Seletividade | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 00009 ou 00087 | - | Qualitativo | Total inibição (0) | - |
| | | | | Especificidade | | <i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 00006 00025 | - | Qualitativo | - | Colónias brancas a verdes-bege. |

* World Data Centre For Microorganisms

Fonte: Adaptado de ISO 11133:2014

ANEXO A (continuação)

| Meio de Cultura | Tipo de Meio | Microorganismos | Norma Internacional | Tipo de Teste | Incubação | Estirpes de controlo | Número WDCM* | Meio de Referência | Natureza do Método | Critério | Características |
|-----------------|--------------|--|---------------------|---------------|----------------------------|--|---|----------------------------------|--------------------|--|--|
| XLD | S | <i>Salmonella</i> | ISO 6579 | Produtividade | (24 ± 3) h/ (37 ± 1) °C | <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis | 00031 00030 | - | Qualitativo | Bom Crescimento (2) | Colónias vermelhas transparentes com o centro preto. |
| | | | | Seletividade | | <i>Escherichia coli</i> | 00012 ou 00013 | - | Qualitativo | Crescimento ou Parcial Inibição (0 - 1) | Colónias amarelas. |
| YEA | S | Flora Total | ISO 6222 | Produtividade | (44 ± 4) h/ (36 ± 2) °C | <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spiritzemii</i> | 00012 ou 00013 00003 | Meio YEA anteriormente validado. | Quantitativo | PR ≥ 0,7 | - |
| Half-Fraser | L | <i>Listeria monocytogenes</i> | ISO 11290-1 | Produtividade | (24 ± 2) h/ (30 ± 1) °C | <i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> | 00021 00012 ou 00013 00009 | - | Qualitativo | > 10 colónias no meio Agar <i>Listeria</i> | Colónias verde azuladas com halo opaco. |
| | | | | | | <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 + <i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> | 00109 00012 ou 00013 00009 ou 00087 | | | | |
| | | | | Seletividade | | <i>Escherichia coli</i> | 00012 ou 00013 | - | Qualitativo | Total inibição (0) no meio TSA | - |
| | | | | | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 00009 ou 00087 | - | Qualitativo | < 100 no meio TSA | - |
| BPW | L | Pré-Enriquecimento para a deteção de <i>Salmonella</i> | ISO 6579 | Produtividade | (18 ± 2) h/ (37 ± 1) °C | <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> <i>Salmonella</i> Enteritidis | 00031 00030 | - | Qualitativo | Turbidez (1 - 2) | - |

* World Data Centre For Microorganisms

Fonte: Adaptado de ISO 11133:2014

ANEXO A (continuação)

| Meio de Cultura | Tipo de Meio | Microorganismos | Norma Internacional | Tipo de Teste | Incubação | Estirpes de controlo | Número WDCM* | Meio de Referência | Natureza do Método | Critério | Características |
|--------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------|---------------|--------------------------------|--|--|--------------------|--------------------|--|---|
| MKTTn | L | <i>Salmonella</i> | ISO 6579 | Produtividade | (24 ± 3) h/ (37 ± 1) °C | <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium + <i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 00030 00031 00012 ou 00013 00025 | - | Qualitativo | > 10 colónias em meio XLD | Características das colónias de acordo com o meio (ver ISO 6579). |
| | | | | Seletividade | | <i>Escherichia coli</i> | 00012 ou 00013 | - | Qualitativo | Inibição Parcial, ≤ 100 colónias no meio TSA | - |
| | | | | | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 00009 ou 00087 | - | Qualitativo | < 10 no meio TSA | - |
| RVS | L | <i>Salmonella</i> | ISO 19250 | Produtividade | (24 ± 3) h/ (41,5 ± 1) °C | <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium + <i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 00030 00031 00012 ou 00013 00025 | - | Qualitativo | > 10 colónias em meio XLD | Características das colónias de acordo com o meio (ver norma). |
| | | | | Seletividade | | <i>Escherichia coli</i> | 00012 ou 00013 | - | Qualitativo | Inibição Parcial, ≤ 100 colónias no meio TSA | - |
| | | | | | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 00009 ou 00087 | - | Qualitativo | < 10 no meio TSA | - |
| Caldo Tingücolato | L | <i>Clostridium perfringens</i> | ISO 7937 | Produtividade | (21 ± 3) h/ (37 ± 1) °C | <i>Clostridium perfringens</i> | 7 | - | Qualitativo | Turbidez (1 - 2) | - |
| Solução de Peptona Sal** | L | Dilente líquido | ISO 8199 | Dilente | 45 min - 1 h/ 20 °C - 25 °C | <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> | 00012 ou 00013 00034 | TSA | Quantitativo | ± 30 % colónias/ T0 (± 30 % da contagem inicial). | - |

* World Data Centre For Microorganisms

** Critérios utilizados para o teste do meio *Tryptone Salt* (TS)

Fonte: Adaptado de ISO 11133:2014

ANEXO B – Ficha Técnica do meio Tryptone Bile X-glucuronide agar (TBX)

BIO-RAD

Bio-Rad
Certificate of Analysis

| | | | |
|-----------------------|---------------|--|--|
| Material Description: | TBX Agar 500g | | |
| Material Number: | 3564035 | | |
| Batch Number: | 64264136 | | |
| Manufacture Date: | 2019-03-22 | | |
| Expiration Date: | 2024-03-20 | | |

| Characteristic | Specification | | Results |
|----------------------------------|--|-------------|--------------|
| | Lower Limit | Upper Limit | |
| Labeling | Specifications see above | | Conforms |
| Appearance Dehydrated powder | Light yellow | | Conforms |
| Appearance Prepared medium | Clear, ± amber yellow | | Conforms |
| pH after sterilization (25°C) | 7.0 | 7.4 | <u>7.1</u> ✓ |
| Productivity Test | | | |
| Escherichia coli WDCM_00013 | Blue colonies Productivity ratio PR ≥ 0.5 | | Conforms ✓ |
| Escherichia coli WDCM_00202 | Blue colonies Productivity ratio PR ≥ 0.5 | | Conforms ✓ |
| Specificity Test | | | |
| Citrobacter freundii WDCM_00006 | White to green-beige colonies | | Conforms |
| Selectivity Test | | | |
| Enterococcus faecalis WDCM_00087 | Total inhibition | | Conforms |

Route de Cassel, 59114 Steenvoorde, France

Page 1 of 2

