

Habilitação para Laboratórios de Microbiologia

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA – CNI

Presidente: Armando de Queiroz Monteiro Neto

SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL – SENAI

Conselho Nacional

Presidente: Armando de Queiroz Monteiro Neto

SENAI - Departamento Nacional

Diretor-Geral: José Manuel de Aguiar Martins

Diretora de Operações: Regina Maria de Fátima Torres

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Diretor-Presidente: Dirceu Raposo de Mello

Diretores

Cláudio Maierovitch P. Henriques

Franklin Rubinstein

Maria Cecília Martins Brito

Vitor Hugo Costa Travassos da Rosa



Confederação Nacional da Indústria
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
Departamento Nacional



Habilitação para Laboratórios de Microbiologia

Séries
Temáticas

Série

Habilitação

3

Laboratório

Brasília
2005

© 2000. Eurachem Netherlands.

Direitos reservados desta edição, em língua portuguesa, para a ANVISA

ANVISA

Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública - GGLAS

SENAI/DN

Unidade de Tecnologia Industrial - UNITEC

Nota sobre a publicação

Este documento aplica-se à habilitação na Reblas e é complementar à Norma NRB ISO 17 025, de janeiro de 2001, versão brasileira, "Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaios e Calibração".

FICHA CATALOGRÁFICA

E91a

Eurachem Netherlands.

Accreditação para laboratórios de microbiologia/ Eurachem Netherlands Laboratory of the Government Chemist of United Kingdom; tradução ANVISA. - Brasília: SENAI/DN, 2005.

37 p. ; 21 cm. - (Série Habilitação; 3)

Tradução de: Accreditation for Microbiological Laboratories.

ISBN

1. Laboratório 2. Microbiologia I. Título 2. Série

CDU 542.2

ANVISA

Agencia Nacional de
Vigilância Sanitária

Sede

SEPN 515, Bloco B
Edifício Omega
70776502- Brasília- DF
Tel.(0xx61) 448000
Fax:.(0xx61) 448186
E-mail: infovia@anvisa.gov.br
<http://www.anvisa.gov.br>

SENAI

Serviço Nacional de
Aprendizagem Industrial
Departamento Nacional

Sede

Setor Bancário Norte
Quadra F Bloco C
Edifício Roberto Simonsen
70040903- Brasília- DF
Tel.: (0xx61) 349544
Fax: (0xx61) 349550
<http://www.senai.br>

Apresentação

É com enorme satisfação que colocamos à disposição dos profissionais de saúde do setor regulado, da comunidade acadêmica e dos demais interessados as “Séries Temáticas Anvisa”. Trata-se de uma nova linha editorial que vem suprir uma carência de publicações oficiais destinadas à orientação técnico-científica de diversos setores ligados à Vigilância Sanitária, somando-se a outras iniciativas editoriais no âmbito do Ministério da Saúde que visam a democratizar o acesso às informações em Saúde Pública, como direito de cidadania.

Sem periodicidade definida ou limitação de títulos, as “Séries Temáticas” fornecem às diversas áreas técnicas da Anvisa um canal apropriado de consolidação e disseminação de conteúdos específicos orientados para públicos de interesse, sempre levando em consideração os elementos de conveniência, oportunidade e prioridade dos temas propostos.

O assunto que inaugura as “Séries Temáticas” é Habilitação de Laboratórios. Nessa primeira série de publicações, o tema será abordado em dez volumes, resultantes de um acordo de cooperação entre a área de Laboratórios da Anvisa e a Rede EURACHEM, detentora original dos títulos traduzidos para o português. A Rede EURACHEM é formada por organizações nacionais européias que têm como objetivo o estabelecimento de um sistema de rastreabilidade internacional dos resultados de medição química, além de promover as boas práticas laboratoriais.

Esperando que esta publicação seja de significativa importância para os profissionais e usuários do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, colocamo-nos à disposição para o recebimento de comentários e de sugestões para as próximas edições das “Séries Temáticas Anvisa”.

ANVISA

Prefácio

A Sociedade Brasileira de Microbiologia parabeniza a Anvisa pela publicação deste manual EURACHEM (GUIA EA 04/10) traduzido para a língua portuguesa. Esse texto vem preencher uma importante lacuna encontrada nas publicações técnicas e científicas disponíveis em nosso país relativas ao tema habilitação de laboratórios de microbiologia. Embora seja destinado principalmente para laboratórios que realizam ensaios microbiológicos em alimentos e amostras ambientais, os princípios gerais são abrangentes e, assim, podem ser extrapolados para outras áreas da microbiologia.

A publicação deste manual não poderia ser mais oportuna, pois é de máxima urgência e importância que os laboratórios de microbiologia do País tenham acesso fácil à orientação adequada, cientificamente embasada, para o aperfeiçoamento de suas atividades e para o atendimento dos requisitos necessários para sua habilitação pelas autoridades competentes nacionais e internacionais. O aprimoramento da legislação brasileira, em consonância com regulamentos internacionais, determina que os laboratórios que realizam ensaios microbiológicos busquem implementar um Sistema da Qualidade, aperfeiçoando-o sempre que necessário. Esta publicação será um importante instrumento de orientação para os laboratórios que desejem atingir excelência nos trabalhos que realizam.

Bernadette D.G.M. Franco e Mário Killner
Sociedade Brasileira de Microbiologia
www.sbmicrobiologia.org.br

Mensagem do Diretor-Geral do SENAI

A publicação da Série Temática da EURACHEM traz consigo a expectativa do SENAI de difundir conhecimento para a rede de laboratórios brasileiros, tornando acessíveis informações que contribuam para o seu desenvolvimento técnico-científico, com ganhos na produtividade, na qualidade dos produtos e serviços e na eliminação de desperdícios.

Sua elaboração e conseqüente disseminação fazem parte de uma sucessão de ações entre a Anvisa e o SENAI voltadas para laboratórios analíticos, explicitando a relação de cooperação entre as instituições para a promoção de ações que venham beneficiar a saúde pública.

Esperamos que essa iniciativa traga ganhos definitivos para toda a sociedade brasileira, seja contribuindo para a implementação das boas práticas laboratoriais - resultando em maior confiabilidade dos resultados analíticos -, como, também, promovendo a segurança dos produtos e serviços oferecidos à população.

José Manuel de Aguiar Martins
Diretor-Geral do SENAI

Mensagem da Presidente da EURACHEM

É com grato prazer que me dirijo à rede de laboratórios brasileiros, cuja missão é contribuir com as suas boas práticas e resultados analíticos de qualidade para a garantia e desenvolvimento do bem-estar público. Neste período de grande alerta e empenhamento coletivo em introduzir novos desenvolvimentos científicos e técnicos no sentido de garantir comparabilidade de resultados de medições, emergentes de cadeias de rastreabilidade bem definidas, por meio da utilização de metodologias validadas, é particularmente louvável o esforço sistemático de formação e desenvolvimento das instituições brasileiras, particularmente o que me é dado a perceber da Anvisa.

A EURACHEM é uma rede de organizações nacionais europeias, juntamente com a Comissão Europeia, que tem por objetivo estabelecer um sistema para a rastreabilidade internacional dos resultados de medições químicas e promover as boas práticas laboratoriais. Constituído um foco para a química analítica e para as questões pertinentes de qualidade, a EURACHEM é um fórum propício à discussão de problemas comuns e ao desenvolvimento de abordagens informadas das questões técnicas e de política laboratorial. Laboratórios primários, de calibração e de serviços, sentem a necessidade de ver reconhecida a sua competência e a qualidade dos resultados que produzem e, para isso, procuram a habilitação por organismos nacionais ou internacionais independentes. Habilitados e habilitadores movem-se pela mesma exigência de qualidade e, assim sendo, os princípios orientadores serão os mesmos.

A EURACHEM, sensível e atenta às necessidades e prioridades dos laboratórios, tem, por intermédio dos seus grupos de trabalho, produzido guias temáticos, que, pela sua oportunidade, se têm revelado da mais elevada e vasta aceitação. Para mais fácil assimilação, são cada vez mais os países a reconhecer a necessidade e a levar à prática a preparação de traduções de alguns desses guias nas várias línguas, sendo já vários os países europeus cujas delegações nacionais da EURACHEM realizaram tal tarefa com sucesso gratificante. De todos, talvez o mais divulgado seja o Guia para a Quantificação da Incerteza em Medições Analíticas. De qualquer modo, todos eles estão completamente acessíveis na língua inglesa, livres de qualquer limitação de acesso ou impressão, na página da EURACHEM. Também por meio dos *links* às páginas das EURACHEM nacionais, é possível, em alguns casos, ter acesso às respectivas traduções. Igualmente, diversos organismos têm solicitado autorização para polícopiar e divulgar pelos seus membros tais Guias, o que tem sido apoiado pela EURACHEM, salvaguardadas as questões de respeito pela propriedade intelectual. Mantendo forte colaboração com organismos internacionais afins e complementares, a EURACHEM prima por uma postura de correção científica e de harmonização de procedimentos e abordagens, o que cimenta e expande a sua missão.

Por uma feliz coincidência, a manifestação de interesse da Anvisa em traduzir os Guias da EURACHEM e torná-los acessíveis aos seus associados ocorre num período em que um químico analista português preside a EURACHEM. Em nome da instituição que represento e em meu nome pessoal, é com enorme orgulho e satisfação que aponho o meu nome a esta iniciativa da Anvisa e de seus dirigentes, que será, para além do que de positivo representa para a nação brasileira, um valioso contributo para o fortalecimento da aproximação entre os nossos dois países de língua portuguesa e destes com o mundo.

Lisboa, março de 2004.

Dra. Maria Filomena Gomes Ferreira Crujo Camões
Presidente da EURACHEM

Sumário

Apresentação

Prefácio

Mensagem do Diretor-Geral do SENAI

Mensagem da Presidente da EURACHEM

1	Introdução e objetivo do documento	11
2	Pessoal	12
3	Ambiente	12
	3.1 Dependências	12
	3.2 Monitoração ambiental	15
	3.3 Higiene	15
4	Validação de métodos de ensaios	16
5	Incerteza de medição	17
6	Equipamentos - manutenção, calibração e verificação de desempenho	18
	6.1 Manutenção	18
	6.2 Calibração e verificação de desempenho	19
7	Reagentes e meios de cultura	22
	7.1 Reagentes	22
	7.2 Meios preparados no laboratório	22
	7.3 Meios prontos para uso	22
	7.4 Rotulagem	23
8	Materiais de referência e culturas de referência	24
	8.1 Materiais de referência	24
	8.2 Culturas de referência	24
9	Amostragem	25
10	Manuseio e identificação das amostras	25

11	Descarte de resíduos contaminados	26
12	Garantia da qualidade dos resultados / controle da qualidade do desempenho	26
	12.1 Controle interno da qualidade	26
	12.2 Avaliação externa da qualidade (ensaios de proficiência)	27
13	Relatórios de Ensaio	27
	APÊNDICES	28
	Apêndice A	28
	Apêndice B	31
	Apêndice C	32
	Apêndice D	33
	Apêndice E	34
	Apêndice F	36

Os requisitos gerais para habilitação são apresentados na Norma Internacional Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração (ISO/IEC 17 025 1.ª ed., 1999), daqui por diante chamada de ISO 17 025. Todos esses requisitos devem ser atendidos pelos laboratórios que buscam habilitação.

Este documento complementa a ISO 17 025, por fornecer orientação específica para laboratórios que realizam ensaios microbiológicos. Fornece orientação detalhada sobre a interpretação da ISO 17 025 para aqueles que realizam análises de diferentes produtos e matrizes. A orientação é aplicável ao desempenho de todas as medições objetivas, quer de rotina, fora-de-rotina, ou como parte da pesquisa e desenvolvimento. Embora seja destinado principalmente para ensaios microbiológicos ambientais e de alimentos, os princípios gerais podem ser aplicados a outras áreas. A ISO 17 025 continua sendo o documento oficial e, em casos de discordância, os organismos de acreditação deverão se pronunciar sobre questões não-resolvidas. A orientação dada neste documento é útil também para laboratórios que estejam buscando habilitação usando outras normas de qualidade, tais como BPL (Boas Práticas de Laboratório), BPF (Boas Práticas de Fabricação) e BPC (Boas Práticas Clínicas).

- 1.3 Este documento pode ser considerado um "Documento de Aplicação" para ensaios microbiológicos, conforme descrito no Anexo B da ISO 17 025. Este documento foi produzido em conjunto pela EURACHEM e a European Accreditation como um meio de promover uma abordagem consistente para habilitação de laboratórios entre entidades-membro da European Accreditation, particularmente entre aquelas participantes do Acordo Multilateral da European Accreditation.
- 1.4 Ensaios microbiológicos incluem testes de esterilidade, detecção, isolamento, enumeração e identificação de microrganismos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) e seus metabólitos em diferentes materiais e produtos, ou qualquer espécie de ensaio que utilize microrganismos como parte do método de detecção, bem como incluem o uso de microrganismos para ensaios ecológicos. Portanto, algumas das orientações deste documento, por exemplo, em ambiente de laboratório, deverão ser apropriadamente interpretadas. Este documento também pode servir de orientação para laboratórios que atuam em áreas relacionadas à microbiologia, tais como bioquímica, biologia molecular e cultura celular, embora possam haver requisitos adicionais para tais laboratórios.
- 1.5 Este documento enfoca a qualidade dos resultados de ensaio e não está voltado especificamente para questões de saúde e segurança. Porém, as práticas de laboratório devem obedecer aos regulamentos nacionais de saúde e segurança. É importante observar que, em alguns casos, questões de saúde e segurança podem ter um efeito sobre a qualidade dos ensaios e o laboratório deverá levar isso em consideração.
- 1.6 As definições dos termos usados são apresentadas no Apêndice A.

- 2.1 Ensaios microbiológicos devem ser realizados ou supervisionados por pessoal experiente, qualificado em microbiologia ou equivalente. Qualificações alternativas podem satisfazer aos requisitos quando o pessoal tiver ampla experiência relativa ao objetivo de habilitação do laboratório. O pessoal deve ter experiência em trabalhos práticos antes de obter autorização para realizar, sem supervisão, tarefas cobertas pelo objetivo da acreditação, ou antes de ser considerado apto para supervisionar o trabalho acreditado. Regulamentos nacionais específicos podem prevalecer sobre a orientação dada neste documento.
- 2.2 Se o laboratório incluir opiniões e interpretações dos resultados de ensaios nos relatórios, isso deve ser feito por pessoal autorizado, com experiência adequada e conhecimento relevante para a aplicação específica, incluindo, por exemplo, requisitos legais, tecnológicos e critérios de aceitação.
- 2.3 A gerência do laboratório deve garantir que todo o pessoal tenha recebido treinamento adequado para o desempenho competente de ensaios e operação de equipamentos. Isso inclui treinamento em técnicas básicas, tais como: semeadura em placas, contagem de colônias, trabalhos em condição de assepsia etc., com o uso de critérios para determinar níveis de aceitação. O pessoal do laboratório somente pode realizar ensaios se for reconhecidamente capacitado para fazê-lo ou se estiver sob supervisão adequada. A capacitação contínua deve ser monitorada, sendo capaz de detectar necessidades de reciclagem. Quando um método ou técnica não for de uso constante, pode ser necessária a verificação do desempenho do pessoal previamente à realização dos ensaios. O intervalo entre as verificações de desempenho deve ser estabelecido e documentado. A interpretação dos resultados de ensaio para identificação e verificação de microrganismos é fortemente relacionada com a experiência do analista e deve ser monitorada regularmente para cada analista.
- 2.4 Em alguns casos, pode ser mais apropriado capacitar o analista para a realização de uma técnica ou para o uso de um instrumento específico, ao invés de capacitá-lo à execução de um método analítico completo.

3.1 *Dependências*

- 3.1.1 Um laboratório típico é composto pelas instalações de ensaio (onde os ensaios microbiológicos e as atividades associadas são conduzidos) e por instalações auxiliares (acessos, corredores, prédios da administração, vestiários, banheiros, almoxarifados, arquivos etc.). Em geral, existem requisitos ambientais específicos para as instalações de ensaio.

Dependendo dos tipos de ensaio realizados, o acesso ao laboratório microbiológico deve ser restrito ao pessoal autorizado. Quando tais restrições estiverem em vigor, o pessoal deve ser informado quanto ao que segue:

- (a) Uso estabelecido para uma área específica;
- (b) Restrições impostas ao trabalho dentro dessas áreas;
- (c) As razões para a existência de tais restrições;
- (d) Níveis de contenção adequados.

3.1.2 O laboratório deve possuir um fluxo que minimize riscos de contaminação cruzada, quando esses riscos forem significativos para o tipo de ensaio realizado. As maneiras para alcançar esse objetivo podem ser:

- (a) Construir o laboratório segundo o princípio de disposição "sem possibilidade de retorno";
- (b) Trabalhar de maneira seqüencial, tomando precauções apropriadas para garantir a integridade dos ensaios e das amostras (por exemplo, com uso de recipientes fechados);
- (c) Separar atividades por tempo ou espaço.

3.1.3 Geralmente, se consideram boas práticas possuir locais separados, ou áreas claramente designadas, para o seguinte:

- ▶ Recepção de amostras e áreas de armazenamento;
- ▶ Preparação das amostras para ensaio (por exemplo: um local separado deve ser usado para produtos em pó com possibilidade de contaminação elevada);
- ▶ Análise das amostras, incluindo a incubação;
- ▶ Manutenção dos microrganismos de referência;
- ▶ Preparação dos meios de cultura, equipamentos e vidrarias, incluindo esterilização;
- ▶ Avaliação de esterilidade, quando pertinente;
- ▶ Descontaminação.

A área de lavagem (após descontaminação) pode ser compartilhada com outras áreas do laboratório, desde que sejam tomadas as precauções necessárias para impedir a contaminação cruzada por traços de substâncias que possam interferir no desenvolvimento microbiano. A necessidade da separação física deve ser julgada com base nas atividades específicas do laboratório (por exemplo: quantidades e tipos de ensaios conduzidos).

Materiais de laboratório não devem ser transportados com frequência de uma área para outra para evitar contaminação cruzada

acidental. No laboratório de biologia molecular, cada área de trabalho (ambientes de trabalho com baixas/médias/altas cargas de DNA) deve ter pipetas, ponteiras, centrífugas, tubos etc. de uso exclusivo.

- 3.1.4 O espaço deve ser suficiente para permitir que as áreas de trabalho sejam mantidas limpas e arrumadas. O espaço deve ser proporcional ao volume de análises realizadas e à organização interna do laboratório. O espaço deve estar de acordo com o especificado pela legislação nacional, quando existente.
- 3.1.5 Os recintos de trabalho devem ter ventilação e temperatura apropriadas. Isso pode ser obtido por ventilação natural ou forçada ou pelo uso de um condicionador de ar. Devem ser usados filtros apropriados quando do uso de condicionadores de ar. Os filtros devem ser adequadamente inspecionados, conservados e substituídos de acordo com o tipo de trabalho realizado.
- 3.1.6 A redução de contaminação pode ser obtida por meio de:
- ▶ paredes, tetos, pisos e bancadas com superfície lisa (rugosidade de uma superfície é determinada pela facilidade de limpeza). Não se recomenda azulejo para revestimento de bancadas;
 - ▶ cantos arredondados entre os pisos, paredes e tetos;
 - ▶ abertura mínima de janelas e portas durante a realização de ensaios;
 - ▶ protetores contra insolação, colocados externamente ao edifício; fácil acesso para limpeza dos protetores contra insolação, caso seja impossível colocá-los do lado de fora do edifício;
 - ▶ tubulações que não passem por cima das superfícies de trabalho, exceto quando hermeticamente vedadas;
 - ▶ sistema de ventilação dotado de entrada de ar com filtro antipoeira;
 - ▶ instalações para lavagem das mãos, preferencialmente com torneiras acionadas sem o uso das mãos;
 - ▶ armários até o teto;
 - ▶ eliminação de qualquer madeira áspera e sem tratamento;
 - ▶ superfícies de madeiras, conexões e ferragens adequadamente seladas;
 - ▶ materiais e equipamentos estocados de modo a facilitar a limpeza;
 - ▶ eliminação de mobília, documentos ou outros itens, além daqueles estritamente necessários às atividades de ensaio.

Essa lista não está completa e nem todos os exemplos se aplicam a todas as situações.

O ideal é que tetos tenham superfície lisa, com iluminação embutida. Quando isso não for possível (como em caso de tetos suspensos e luzes pendentes), o laboratório deve ter registros de controle dos aspectos que possam resultar em riscos para a higiene e ter meios eficazes para solucioná-los, como, por exemplo, com um programa de inspeção e limpeza das superfícies.

- 3.1.7 Quando os laboratórios estão localizados em áreas de produção industrial, o pessoal deve estar ciente do potencial de contaminação das áreas de produção e deve demonstrar que tomou as medidas apropriadas para evitar tais ocorrências.

3.2 *Monitoração ambiental*

- 3.2.1 Deve haver um programa de monitoração ambiental apropriado, como, por exemplo, a exposição de placas ao ar e swabs de superfícies. As contagens ambientais aceitáveis devem ser determinadas e deve haver um procedimento documentado para quando estes limites forem ultrapassados. A análise dos dados deve permitir a determinação de tendências nos níveis de contaminação.

3.3 *Higiene*

- 3.3.1 Deve haver um programa de limpeza documentado para instalações, equipamentos e superfícies de laboratório que considere resultados de monitoração ambiental e a possibilidade de contaminação cruzada, bem como um procedimento para lidar com derramamentos.
- 3.3.2 Deve haver espaço suficiente de armazenamento para que seja possível a limpeza, evitando o acúmulo de poeira. O registro de dados em papel deve ser reduzido ao mínimo e deve ser proibido plantas e pertences pessoais na área de trabalho do laboratório.
- 3.3.3 Roupas apropriadas ao tipo de ensaio realizado (incluindo, se necessário, proteção para cabelo, barba, mãos, sapatos etc.) devem ser usadas no laboratório de microbiologia e removidas antes da saída do local de trabalho. Isso é particularmente importante no laboratório de biologia molecular, onde, por exemplo, o deslocamento de uma área de alta carga de DNA para uma de baixa carga de DNA possa introduzir contaminação cruzada. Em muitos laboratórios, um jaleco de laboratório pode ser suficiente.
- 3.3.4 Instalações adequadas para lavagem das mãos devem estar disponíveis.

- 4.1 A validação de métodos de ensaios microbiológicos deve refletir as reais condições de trabalho. Isso pode ser obtido pelo uso de produtos naturalmente ou artificialmente contaminados, com um nível predeterminado de organismos contaminantes. O analista deve estar ciente de que a adição de organismos contaminantes a uma matriz somente simula, de maneira superficial, a presença dos contaminantes de ocorrência natural. Contudo, freqüentemente essa é a melhor e única solução disponível. A validação irá depender do método e da aplicação.

Em caso de matrizes não especificadas no procedimento-padrão, o laboratório deverá validar os métodos para estas matrizes.

- 4.2 Métodos qualitativos de ensaios microbiológicos, em que o resultado é expresso em termos de presença/ausência, assim como procedimentos de confirmação e identificação, quando necessário, devem ser validados pela determinação da especificidade, erro relativo, falso-positivo, falso-negativo, limite de detecção, efeito da matriz, repetitividade e reprodutibilidade (ver Apêndice A para definições).
- 4.3 Para métodos quantitativos de ensaios microbiológicos, a especificidade, sensibilidade, erro relativo, desvio positivo, desvio negativo, repetitividade, reprodutibilidade e limite de quantificação dentro de uma variabilidade definida devem ser considerados e, se necessário, determinados quantitativamente. As diferenças relativas às matrizes devem ser levadas em conta ao se analisar diferentes tipos de amostras. Os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados.
- 4.4 Os laboratórios devem guardar os dados de validação dos kits analíticos comerciais usados no laboratório. Esses dados de validação podem ser obtidos por meio de ensaios colaborativos e pela validação de dados encaminhados pelo fabricante e avaliados por uma terceira parte (por exemplo: AOAC). Se os dados de validação não estiverem disponíveis ou não forem inteiramente aplicáveis, o laboratório deve ser responsável pela validação do método.
- 4.5 Se for necessário o uso de uma versão modificada do método para que o mesmo seja atendido, de acordo com a mesma especificação do método original, o laboratório deve fazer comparações usando replicatas. O delineamento experimental e a análise de resultados devem ser estatisticamente válidos.
- 4.6 Mesmo quando a validação estiver concluída, o analista precisará ainda verificar se o desempenho documentado pode ser atingido, por exemplo, pelo uso de amostras artificialmente contaminadas ou materiais de referência com matrizes relevantes.

- 5.1 A definição internacional para incerteza de medição é apresentada no Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia: 1993 da ISO (ver Apêndice B). A abordagem geral para avaliar e expressar a incerteza nos ensaios prevista pelos organismos de habilitação europeus é aquela baseada nas recomendações do Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), conforme descrito no Guia para Expressão da Incerteza de Medição, 1995, ISO Genebra.
- 5.2 Ensaios microbiológicos geralmente estão na categoria daqueles que dispensam o cálculo rigoroso, metrológica e estatisticamente válidos, da incerteza de medição. É geralmente apropriado basear a estimativa da incerteza somente em dados de repetitividade e reprodutibilidade, mas, de maneira ideal, incluindo a tendência (por exemplo, a partir dos resultados dos esquemas de ensaios de proficiência).
- Os componentes individuais da incerteza devem ser identificados e demonstrados como estando sob controle, com avaliação de sua contribuição para a variabilidade dos resultados. Alguns componentes (por exemplo: efeitos da pipetagem, pesagem e diluição) podem ser prontamente medidos e facilmente avaliados para demonstrar uma contribuição desprezível à incerteza total. Outros componentes (por exemplo: estabilidade e preparação da amostra) não podem ser diretamente medidos e sua contribuição não pode ser avaliada de uma maneira estatística, mas sua importância para a avaliação dos resultados deve ser também considerada.
- 5.3 Espera-se que laboratórios de ensaios microbiológicos acreditados tenham ciência da distribuição homogênea, ou não, dos microrganismos nas matrizes que analisam e levem isto em conta por ocasião da subamostragem. Contudo, não se recomenda que esse componente de incerteza seja incluído em estimativas, a não ser que as necessidades do cliente indiquem o contrário. Os principais motivos para isso são que a incerteza decorrente da distribuição de microrganismos dentro da matriz do produto não é uma função do desempenho do laboratório, podendo ser específica para uma amostra individual analisada, e porque métodos de ensaio devem especificar o tamanho da amostra a ser usada, levando em conta a baixa homogeneidade.
- 5.4 O conceito de incerteza não pode ser aplicado diretamente aos resultados de ensaios qualitativos, tais como aqueles obtidos em análises de detecção ou de identificação. Todavia, fontes individuais de variabilidade, como, por exemplo, o desempenho do reagente e a interpretação do analista, devem ser identificadas e deve ser demonstrado estarem sob controle. Adicionalmente, para ensaios em que o limite de detecção é uma indicação de adequação importante, a incerteza associada ao inóculo deve ser estimada e sua importância avaliada. Os laboratórios também devem estar cientes da ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos associados às análises qualitativas por eles usadas.

Como parte de seu sistema da qualidade, o laboratório deve ter um programa documentado para a manutenção, calibração e verificação de desempenho de seus equipamentos.

6.1 *Manutenção*

(O guia sobre manutenção de equipamentos pode ser encontrado na ISO 7.218).

- 6.1.1 A manutenção de equipamentos críticos deve ser realizada em intervalos especificados, de acordo com vários fatores, como, por exemplo, a taxa de uso. Devem ser mantidos registros detalhados da manutenção. Exemplos de manutenção de equipamentos e intervalos são apresentados no Apêndice F.
- 6.1.2 Deve-se prestar atenção para evitar contaminação cruzada provocada por diferentes itens utilizados no laboratório, como, por exemplo:
- ▶ itens descartáveis devem estar limpos e esterilizados quando apropriado;
 - ▶ vidraria deve ser corretamente limpa e esterilizada quando necessário.

De maneira ideal, os laboratórios devem ter uma autoclave separada para descontaminação. Contudo, apenas uma autoclave pode ser aceitável desde que sejam tomadas precauções adequadas para separar cargas de descontaminação e de esterilização e que esteja em vigor um programa documentado de higienização dos ambientes interno e externo da autoclave.

- 6.1.3 Tipicamente, os seguintes itens de equipamentos deverão ser submetidos à limpeza, revisão ou inspeção e, quando pertinente, esterilização:

Itens para serviços gerais - aparelhos de filtração, recipientes de vidro ou plástico (frascos, tubos de ensaio), placas de Petri de vidro ou plástico, instrumentos de amostragem, fios ou alças de platina ou de níquel/cromo ou de material plástico;

Banhos-maria, incubadoras, fluxos laminares, autoclaves, homogeneizadores, geladeiras, freezers;

Equipamentos volumétricos - pipetas, dispensadores automáticos, semeadores em espiral;

Instrumentos de medição - termômetros, cronômetros, balanças, medidores de pH, contador de colônias.

6.2 *Calibração e verificação de desempenho*

6.2.1 O laboratório deve estabelecer um programa para calibração e verificação de desempenho dos equipamentos que possuem influência direta sobre os resultados dos ensaios. A frequência de calibração e a verificação de desempenho deverão ser determinadas pelo histórico documentado do equipamento e serão baseadas na necessidade, tipo e desempenho anterior do equipamento. Os intervalos entre calibração e verificação devem ser inferiores ao necessário para o equipamento permanecer em condições adequadas de uso. Exemplos de intervalos de calibração e verificações típicos de desempenho para vários instrumentos de laboratório são apresentados no Apêndice D e no Apêndice E.

6.2.2 Dispositivos para medição de temperatura

(a) Quando a temperatura possuir efeito direto sobre o resultado de uma análise, ou for decisiva para o desempenho correto do equipamento, os dispositivos medidores de temperatura, como termômetros de vidro, termopares e termômetros com resistência de platina, usados em incubadoras e autoclaves, devem ser de qualidade apropriada para alcançar a precisão necessária.

(b) A calibração dos dispositivos deve ser rastreável a padrões nacionais e internacionais de temperatura. Quando a precisão permitir, podem ser usados dispositivos que atendam às especificações do fabricante (por exemplo: ISO 1 770 para termômetros de vidro). Tais dispositivos podem ser usados para monitorar geladeiras e freezers de armazenamento e também incubadoras e banhos-maria, quando a tolerância aceitável em torno da temperatura-alvo assim o permitir. É necessária a verificação do desempenho de tais dispositivos.

6.2.3 Incubadoras, banhos-maria, estufas de esterilização

A estabilidade da temperatura, a uniformidade de distribuição da temperatura e o tempo necessário para atingir condições de equilíbrio em incubadoras, banhos-maria, estufas de esterilização e salas com temperaturas controladas devem ser inicialmente estabelecidos e documentados, principalmente em relação ao uso normal do equipamento (por exemplo: posição e altura das pilhas das placas Petri e o espaço entre essas pilhas). A manutenção das características registradas durante a validação inicial dos equipamentos deve ser verificada e registrada após cada reparo ou modificação significativa. Os laboratórios devem monitorar a temperatura de operação desse tipo de equipamento e guardar os registros.

6.2.4 Autoclaves, incluindo preparadores de meios

A seqüência a seguir mostra a abordagem necessária para a calibração e monitoração de desempenho. Para garantia da qualidade, devem-

se avaliar materiais e itens processados por autoclavagem, de maneira a detectar eventuais variações de processamento dentro de um mesmo lote e entre lotes diferentes.

(a) Autoclaves devem ser capazes de satisfazer tolerâncias específicas de tempo e temperatura. Painéis de pressão com apenas válvulas de segurança não podem ser utilizadas. Sensores usados para controle ou monitoramento dos ciclos de operação necessitam de calibração e o desempenho dos cronômetros deve ser verificado.

(b) A validação inicial deve incluir estudos de desempenho (pesquisas de distribuição espacial da temperatura) para cada ciclo de operação e cada configuração de carga usada na prática. Esse processo deve ser repetido quando houver reparo ou modificação significativa (por exemplo: troca do programador ou sonda do termorregulador, rearranjos de carga, ciclos de operação) ou quando indicado pelos resultados de verificações do controle de qualidade do meio de cultura. Sensores de temperatura em número suficiente devem ser posicionados dentro da carga (por exemplo: sensores contidos em recipientes com líquidos ou meios) de tal forma que as diferenças de localização possam ser demonstradas. No caso de preparadores de meios, em que o aquecimento uniforme não pode ser demonstrado de outra forma, o uso de dois sensores, um adjacente à sonda de controle e o outro afastado desta, pode ser considerado apropriado. A validação e revalidação devem considerar a adequação dos tempos de elevação e decréscimo da temperatura, bem como o tempo efetivo da temperatura de esterilização.

(c) Devem ser fornecidas instruções operacionais claras, com base nos perfis de aquecimento determinados para usos típicos durante a validação/revalidação. Devem ser estabelecidos critérios de aceitação/rejeição e registros de operações da autoclave, incluindo temperatura e tempo adotados em cada ciclo.

(d) A monitoração pode ser feita de uma das seguintes formas:

(i) uso de um termopar e de um registrador para produzir um gráfico ou relatório impresso;

(ii) observação direta e registro da temperatura máxima alcançada e tempo nessa temperatura.

Além da monitoração direta da temperatura de uma autoclave, a eficiência de sua operação durante cada ciclo pode ser verificada pelo uso de indicadores químicos ou biológicos para fins de esterilização/descontaminação. Tiras indicadoras ou fitas de controle de esterilização devem ser usadas somente para indicar que uma carga foi processada e não para demonstrar que a esterilização tenha sido feita de forma correta.

6.2.5 Pesos e balanças

Pesos e balanças devem ser calibrados regularmente (de acordo com seu uso pretendido), de forma rastreável, em intervalos regulares.

6.2.6 Dispositivos volumétricos

(a) Dispositivos volumétricos, tais como dispensadores automáticos, dispensadores/diluidores, pipetas manuais mecânicas e pipetas descartáveis, podem ser usados no laboratório de microbiologia. Os laboratórios devem realizar uma verificação inicial dos dispositivos volumétricos e então realizar verificações regulares para garantir que os equipamentos estejam operando dentro da especificação requerida. A verificação pode não ser necessária para vidraria que foi certificada para uma tolerância específica. Os dispositivos devem ser verificados quanto à precisão do volume dispensado, em comparação com o volume pré-estabelecido (para diversos ajustes diferentes, no caso de instrumentos com volume variável). A repetitividade dos volumes dispensados deve ser avaliada.

(b) Para dispositivos volumétricos descartáveis os laboratórios devem adquirir os suprimentos de empresas com um sistema de qualidade reconhecido. Após a validação inicial da adequação do dispositivo, recomenda-se a execução de verificações aleatórias de precisão. Se o fornecedor não tiver um sistema de qualidade reconhecido, os laboratórios devem verificar a adequação de cada lote do dispositivo.

6.2.7 Outros dispositivos

Medidores de condutividade, medidores de oxigênio, medidores de pH e outros instrumentos similares devem ser verificados regularmente ou antes de cada uso. As soluções-tampão usadas para fins de verificação devem ser guardadas em condições apropriadas e devem ser identificadas com uma data de validade.

Quando a umidade for importante para o resultado do ensaio, higrômetros devem ser calibrados, sendo a calibração rastreável a padrões nacionais ou internacionais.

Cronômetros, incluindo o cronômetro da autoclave, devem ser verificados, usando-se um cronômetro calibrado ou o sinal de tempo nacional.

Quando centrífugas forem usadas em procedimentos de ensaio, deve ser feita uma determinação da importância da força centrífuga. Quando esta for crítica, a centrífuga precisará ser calibrada.

7.1 *Reagentes*

Os laboratórios devem assegurar que a qualidade dos reagentes usados seja apropriada para o ensaio em questão. Devem verificar a adequação de cada lote de reagentes críticos para o ensaio, inicialmente e durante sua validade, usando microrganismos-controle positivos e negativos que sejam rastreáveis a coleções de culturas nacionais ou internacionais reconhecidas.

7.2 *Meios preparados no laboratório*

7.2.1 O desempenho apropriado dos meios de cultura, diluentes e outras soluções preparadas no laboratório deve ser verificado, quando relevante, com relação:

- ▶ à sobrevivência ou recuperação dos microrganismos-alvo;
- ▶ à inibição ou supressão dos microrganismos não-alvo;
- ▶ a propriedades bioquímicas (diferenciais e diagnósticas);
- ▶ a propriedades físicas (por exemplo: pH, volume e esterilidade).

Para avaliação da recuperação ou sobrevivência de microrganismos deve ser dada preferência a procedimentos quantitativos (ver também ISO 11 133, Parte 1 e 2).

7.2.2 Matérias-primas (formulações comerciais desidratadas e constituintes individuais) devem ser armazenadas sob condições apropriadas, como, por exemplo, em ambiente frio, seco e protegido da luz. Todos os recipientes, especialmente aqueles com meios desidratados, devem ser hermeticamente fechados. Meios desidratados que apresentem alterações, como, por exemplo, empedrados ou com mudança de coloração, não devem ser usados. Água destilada, deionizada, ou produzida por osmose reversa, livre de substâncias bactericidas, inibidoras ou interferentes, deve ser usada na preparação, a não ser que o método de teste especifique de outra forma.

7.2.3 A validade dos meios preparados, mantidos nas condições definidas de armazenamento, deve ser determinada e controlada.

7.3 *Meios prontos para uso*

7.3.1 Todos os meios, diluentes e outras soluções, adquiridos no estado de prontos para uso, ou parcialmente prontos, necessitam de

validação antes do uso. A avaliação de desempenho para recuperação ou sobrevivência dos microrganismos-alvo e a inibição ou supressão dos microrganismos não-alvo deve ser quantitativa. Atributos, tais como propriedades físicas e bioquímicas, devem ser avaliados usando-se critérios objetivos.

7.3.2 Como parte da validação, o laboratório deve possuir conhecimento das especificações de qualidade do fabricante, o que inclui, pelo menos, o seguinte:

- ▶ Nome dos meios e lista dos ingredientes, incluindo quaisquer suplementos;
- ▶ Prazo de validade e critérios de aceitação aplicados;
- ▶ Condições de armazenamento;
- ▶ Frequência de amostragem;
- ▶ Verificação da esterilidade;
- ▶ Verificação de crescimento dos microrganismos de controle alvo e não-alvo (com suas referências da coleção de cultura) e critérios de aceitação;
- ▶ Verificações físicas e critérios de aceitação aplicados;
- ▶ Data de edição da especificação.

7.3.3 Lotes de meios devem ser identificáveis. Cada lote recebido deve vir acompanhado pela evidência de que satisfaz a especificação de qualidade. O laboratório deverá se certificar de que o fabricante notificará quaisquer alterações na especificação da qualidade do produto.

7.3.4 Quando o fabricante de meios prontos para uso ou parcialmente prontos possuir um sistema da qualidade reconhecido, como, por exemplo, a série ISO 9 000, a verificação de conformidade com a especificação inicial do produto pode ser realizada conforme a expectativa de consistência de qualidade dos produtos recebidos. Em outras circunstâncias são necessárias verificações para cada lote recebido.

7.4 Rotulagem

Os laboratórios devem garantir que todos os reagentes, incluindo soluções estocadas, meios, diluentes e outras soluções, sejam adequadamente rotulados, com, pelo menos, indicações quanto à identidade, concentração, condições de armazenamento, data de preparação, prazo de validade e/ou períodos de armazenamento recomendados.

O responsável pela preparação deve ser identificável por intermédio de registros.

8.1 *Materiais de referência*

Materiais de referência e materiais de referência certificados (ver definições no Apêndice A) fornecem rastreabilidade em medições e são usados, por exemplo:

- ▶ Para demonstrar a precisão dos resultados;
- ▶ Para calibrar equipamentos;
- ▶ Para monitorar o desempenho do laboratório;
- ▶ Para validar métodos;
- ▶ Para possibilitar uma comparação de métodos.

Quando possível, materiais de referência devem ser usados em matrizes apropriadas.

8.2 *Culturas de referência*

8.2.1 Culturas de referência são necessárias para o estabelecimento de desempenho dos meios e kits de ensaio, para a avaliação contínua desses meios e kits e para a validação de métodos. A rastreabilidade é necessária no estabelecimento de desempenho dos meios de cultura, na validação de métodos de análise e kits de ensaio. Para demonstrar a rastreabilidade, os laboratórios devem usar cepas de microrganismos de referência obtidas diretamente de uma coleção nacional ou internacional reconhecida, quando esta existir. Como alternativa, podem ser usadas culturas comerciais que o laboratório tenha comprovado ter propriedades equivalentes.

8.2.2 Seguindo a orientação da ISO 11.133-1, cepas de referência podem ser sub-cultivadas uma vez, para fornecer estoques de referência. Verificações bioquímicas e de pureza devem ser feitas em paralelo, conforme necessário. Recomenda-se guardar estoques de referência em alíquotas congeladas ou liofilizadas. Culturas de trabalho, para uso de rotina, devem ser subculturas primárias do estoque de referência (ver Apêndice C sobre preparação de estoques de trabalho). Uma vez descongelados, os estoques de referência não devem ser re-congelados e reutilizados.

8.2.3 Estoques de trabalho não devem ser subcultivados, a não ser que isto seja estabelecido por um método padrão ou que os laboratórios comprovem que não houve nenhuma mudança em qualquer propriedade pertinente.

Os estoques de trabalho não devem ser subcultivados em substituição a estoques de referência. Culturas comerciais somente podem ser usadas como culturas de trabalho.

- 9.1 Em muitos casos, laboratórios de ensaio não são responsáveis pela amostragem inicial para a obtenção das amostras para ensaio. Quando forem responsáveis por isso, recomenda-se que a amostragem possua um sistema de qualidade associado e, de preferência, que o laboratório tenha esse procedimento habilitado.
- 9.2 O transporte e o armazenamento devem ser realizados em condições que mantenham a integridade da amostra (por exemplo: resfriada ou congelada). As condições devem ser monitoradas, mantendo-se os respectivos registros. Quando apropriado, a responsabilidade pelo transporte das amostras e pelo seu armazenamento entre a amostragem e a chegada no laboratório deve ser claramente documentada. Os ensaios das amostras devem ser realizados assim que possível após a amostragem e estar de acordo com as normas e/ou regulamentos nacionais/internacionais vigentes.
- 9.3 A amostragem deve ser executada somente por pessoal treinado e deve ser feita com assepsia, usando-se equipamento esterilizado. As condições ambientais, como, por exemplo, a contaminação do ar e a temperatura, devem ser monitoradas e registradas no local da amostragem. O horário da amostragem deve ser registrado.

- 10.1 A flora microbiana pode ser sensível a fatores como, por exemplo, temperatura ou duração do armazenamento e transporte da amostra. É importante verificar e registrar o estado da amostra na ocasião de recebimento pelo laboratório.
- 10.2 O laboratório deve ter procedimentos que cubram o recebimento e a identificação da amostra. Se houver amostra insuficiente, ou de baixa qualidade devido à deterioração física, temperatura incorreta, embalagem danificada ou rotulagem deficiente, o laboratório deve entrar em contato com o cliente, antes de decidir testar ou recusar a amostra. Em qualquer caso, o estado da amostra deve ser indicado no relatório do ensaio.
- 10.3 O laboratório deve registrar todas as informações relevantes e, de modo particular, as seguintes informações:
- (a) Data e, quando relevante, horário de recebimento;
 - (b) Estado da amostra no recebimento e, quando necessário, a temperatura;
 - (c) Características da operação de amostragem (data da amostragem, condições de amostragem, etc).

- 10.4 As amostras que serão analisadas posteriormente devem ser armazenadas sob condições adequadas para minimizar as variações na população microbiana eventualmente presente. As condições de armazenamento devem ser definidas e registradas.
- 10.5 As embalagens e rótulos das amostras podem estar altamente contaminados e devem ser manipulados e estocados com cuidado, a fim de evitar qualquer disseminação de contaminação.
- 10.6 A subamostragem feita no laboratório imediatamente antes dos ensaios é considerada como parte do método de ensaio. Deve ser feita de acordo com as normas nacionais ou internacionais, caso existam, ou por métodos internos validados. Procedimentos de subamostragem devem ser desenvolvidos levando-se em conta a distribuição desigual dos microrganismos nas amostras (guia geral apresentado na ISO 6 887 e ISO 7 218).
- 10.7 Deve haver um procedimento escrito para a retenção e descarte de amostras. As amostras devem ser guardadas até que os resultados do ensaio estejam disponíveis, ou por um tempo maior, se necessário. As amostras sabidamente contaminadas devem ser descontaminadas antes de serem descartadas (ver 11.1).

11 DESCARTE DE RESÍDUOS CONTAMINADOS

- 11.1 O descarte correto dos materiais contaminados não pode afetar diretamente a qualidade dos ensaios. Devem existir procedimentos para minimizar a possibilidade de contaminação dos materiais ou do ambiente de ensaio. Contudo, esta é uma questão de boas práticas de laboratório e deve obedecer aos regulamentos ambientais ou de saúde e segurança nacionais/internacionais (ver também a ISO 7 218).

12 GARANTIA DA QUALIDADE DOS RESULTADOS / CONTROLE DA QUALIDADE DO DESEMPENHO

12.1 *Controle interno da qualidade*

12.1.1 O controle interno da qualidade abrange todos os procedimentos assumidos por um laboratório para a avaliação contínua de seu trabalho. O principal objetivo é assegurar a consistência dos resultados diários e sua conformidade com critérios definidos.

12.1.2 É necessário um programa de verificações periódicas que demonstre que a variabilidade (entre os analistas e entre equipamentos ou materiais etc.) está sob controle. Todas as análises que fazem parte do escopo da habilitação do laboratório precisam estar incluídas. O programa pode envolver:

- ▶ o uso de amostras artificialmente contaminadas;
- ▶ o uso de materiais de referência (incluindo os de ensaios de proficiência);
- ▶ replicatas de ensaios;
- ▶ replicatas da avaliação dos resultados de ensaio.

O intervalo entre essas verificações será influenciado pela elaboração do programa e pelo número dos ensaios reais. Recomenda-se que, para monitorar o desempenho, os ensaios incorporem controles, quando possível.

- 12.1.3 Em casos especiais, um laboratório pode ser habilitado para um ensaio que seja raramente solicitado a fazer. Em tais casos, o programa de controle interno da qualidade em andamento pode ser inadequado, havendo necessidade de um esquema que demonstre desempenho satisfatório, conduzido em paralelo aos ensaios.

12.2 Avaliação externa da qualidade (ensaios de proficiência)

- 12.2.1 Os laboratórios devem participar regularmente de ensaios de proficiência que sejam relevantes a seus escopos de habilitação, devendo ser dada preferência a esquemas de ensaios de proficiência que utilizem matrizes adequadas. Em casos específicos, a participação pode ser obrigatória.

- 12.2.2 Os laboratórios devem usar avaliação externa da qualidade, não apenas para detectar problemas no laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema da qualidade.

13 RELATÓRIOS DE ENSAIO

- 13.1 Se o resultado da enumeração é negativo, ele deve ser relatado como "não detectado para uma unidade definida" ou "menor que o limite de detecção para uma unidade definida". O resultado não deve ser apresentado como "zero para uma unidade definida", a não ser que ele seja um requisito legal. Os resultados de ensaios qualitativos devem ser relatados como "detectado/não detectado numa quantidade ou volume definido". Eles podem ser também expressos como "menor que um número especificado de organismos para uma unidade definida", quando o número de microrganismos especificado estiver acima do limite de detecção do método e isto tiver sido combinado com o cliente.
- 13.2 Quando uma estimativa da incerteza do resultado do ensaio for expressa no relatório, quaisquer limitações precisam ser esclarecidas com o cliente (particularmente se a estimativa não incluir a falta de homogeneidade da distribuição dos microrganismos na amostra).

APÊNDICES

APÊNDICE A

GLOSSÁRIO	
Calibração	<p>Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre valores indicados por um instrumento ou sistema de medição, ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões.</p> <p>Notas:</p> <p>O resultado de uma calibração permite tanto o estabelecimento dos valores do mensurando para as indicações como a determinação de correções a serem aplicadas.</p> <p>Uma calibração pode, também, determinar outras propriedades metrológicas, como o efeito das grandezas de influência.</p> <p>O resultado de uma calibração pode ser registrado em um documento, algumas vezes denominado certificado de calibração ou relatório de calibração.[VIM: ISO 1993 - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.]</p>
Material de referência certificado	<p>Material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, sendo que cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido. [ISO Guia 30:1992]</p>
Limite de determinação	<p>Aplicado a ensaios microbiológicos quantitativos - o menor número de microrganismos dentro de uma variabilidade definida que pode ser determinada sob condições experimentais do método em avaliação.</p>
Limite de detecção	<p>Aplicado a ensaios microbiológicos qualitativos - o menor número de microrganismos que pode ser detectado, mas em números que não podem ser estimados com precisão.</p>
Desvio negativo	<p>Ocorre quando o método alternativo fornece um resultado negativo sem confirmação, quando o método de referência apresenta um resultado positivo. Este desvio se torna um resultado falso-negativo quando o resultado verdadeiro puder ser comprovado como sendo positivo.</p>

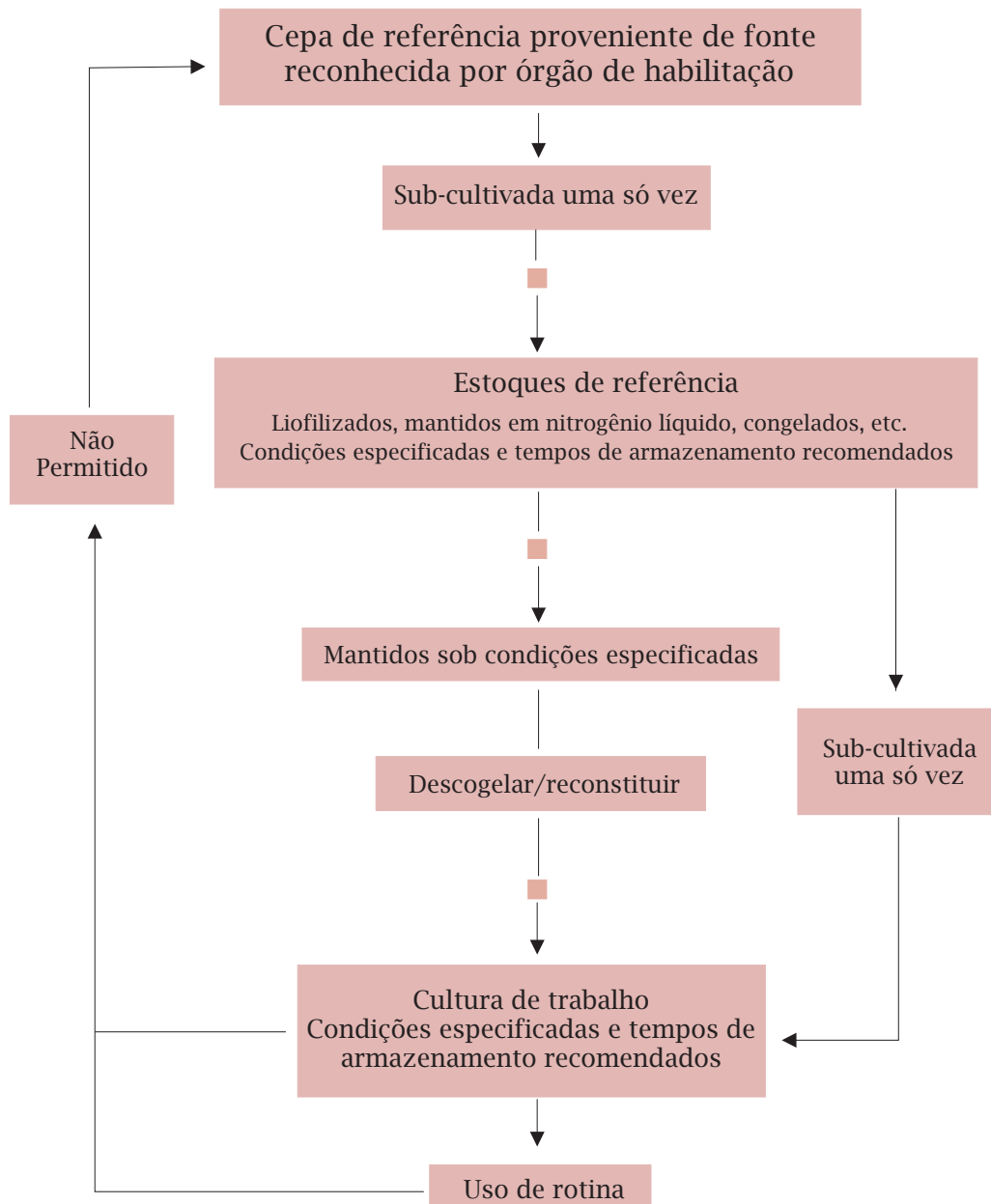
Desvio positivo	Ocorre quando o método alternativo fornece um resultado positivo sem confirmação, quando o método de referência apresenta um resultado negativo. Este desvio se torna um resultado falso-positivo quando o resultado verdadeiro puder ser comprovado como sendo negativo.
Culturas de referência	Termo coletivo para cepas de referência, estoques de referência e culturas de trabalho.
Cepas de referência	Microrganismos identificados pelo menos em nível de gênero e de espécie, catalogados e descritos de acordo com suas características, de referência, mencionando sua origem. [ISO 11 133-1:2000] Normalmente obtidos a partir de uma coleção nacional ou internacional reconhecida.
Material de referência	Material ou substância que tem um ou mais valores de propriedade que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos, para serem usados na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou na atribuição de valores a materiais. [ISO Guia 30:1992]
Método de referência	Método suficientemente investigado, que descreve clara e exatamente as condições e procedimentos necessários para a medição de uma ou mais grandezas que foram demonstrados como tendo exatidão e precisão compatível com seu uso pretendido e que podem ser, portanto, usados para avaliar a exatidão de outros métodos para a mesma medição, particularmente para permitir a caracterização de um material de referência. Normalmente, um método padrão nacional ou internacional.
Estoques de referência	Conjunto de culturas idênticas distintas, obtidas por uma subcultura única a partir da cepa de referência. [ISO 11 133-1:2000]
Veracidade relativa	Grau de correspondência entre os resultados do método sob avaliação e aqueles obtidos usando-se um método de referência reconhecido.
Repetitividade	Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo mensurando sob as mesmas condições de medição. [VIM: ISO 1993 - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.]
Reprodutibilidade	Grau de concordância entre os resultados de medições do mesmo mensurando realizadas sob condições variadas de medição.

	[VIM: ISO 1993 – Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.]
Sensibilidade	Fração do número total de culturas ou colônias positivas corretamente identificadas na inspeção presuntiva. [ISO 13 843:2000]
Especificidade	Fração do número total de culturas ou colônias negativas corretamente identificadas na inspeção presuntiva. [ISO 13 843:2000]
Cultura de trabalho	Subcultura primária de um estoque de referência. [ISO 11 133-1:2000]
Validação	Confirmação, pela obtenção de evidência objetiva, de que os requisitos para uso ou aplicação especificamente pretendidos foram cumpridos. [ISO 9 000:2000]
Verificação	Confirmação, pela obtenção de evidência objetiva, de que os requisitos especificados foram cumpridos. [ISO 9 000:2000]

APÊNDICE B

REFERÊNCIAS	
1.	ISO/IEC 17 025, Requisitos gerais para a competência dos laboratórios de ensaio e calibração.
2.	ISO 7 218, Microbiologia de alimentos e substâncias alimentícias para animais — Regras gerais para exames microbiológicos.
3.	ISO 6 887-1, Preparação de diluições.
4.	ISO Guia 30, Termos e definições usados em relação a materiais de referência.
5.	ISO 9 000; Sistemas para gestão da qualidade — fundamentos e vocabulário.
6.	VIM: ISO 1993 - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia.
7.	ISO (CIPM): 1995, Guia para a expressão da incerteza de medição.
8.	Minuta ISO/DIS 16.140, Microbiologia de alimentos. Protocolo para a validação de métodos alternativos.
9.	ISO 13 843, Qualidade da água — Guia para validação de métodos microbiológicos.
10.	ISO 11 133-1, Microbiologia de alimentos e substâncias alimentícias para animais. Diretrizes para preparação e produção de meios de cultura. Parte 1 — Diretrizes gerais sobre garantia de qualidade para a preparação de meios no laboratório.
11.	Minuta ISO/FDIS 11 133-2, Microbiologia de alimentos e substâncias alimentícias para animais. Diretrizes para preparação e produção de meios de cultura. Parte 2 — Diretrizes práticas sobre ensaios de desempenho em meios de cultura.
12.	EN 12 741, Biotecnologia — Laboratórios para pesquisa, desenvolvimento e análise — Orientação para operações em laboratórios de biotecnologia.

Uso geral das culturas de referência



* Verificações de pureza e testes bioquímicos em paralelo, conforme apropriado.

Todas as partes do processo devem ser inteiramente documentadas, mantendo-se registros detalhados de todas as etapas.

APÊNDICE D

Guia de calibração e verificações de calibração

Estas informações são fornecidas para fins de orientação e a frequência será baseada na necessidade, tipo e desempenho prévio do equipamento.

TIPO DE EQUIPAMENTO	REQUISITO	FREQÜÊNCIA SUGERIDA
Termômetros de referência (líquido em vidro)	Recalibração inteiramente rastreável Um único ponto (p. ex.: verificação do ponto de congelamento)	A cada 5anos Anualmente
Termopares de referência	Recalibração inteiramente rastreável Verificação com termômetro de referência	A cada 3anos Anualmente
Termômetros de trabalho e Termopares de trabalho	Verificação com termômetro de referência no ponto de congelamento e/ou faixa de temperaturas operacionais	Anualmente
Balanças	Calibração inteiramente rastreável	Anualmente
Pesos de calibração	Calibração inteiramente rastreável	A cada 5 anos
Peso(s) aferidor(es)	Verificação com peso calibrado ou verificação na balança imediatamente após a calibração rastreável	Anualmente
Vidrarias volumétricas	Calibração gravimétrica na tolerância exigida	Anualmente
Microscópios	Calibração rastreável de micrômetro de mesa (onde apropriado)	Inicialmente
Higrômetros	Calibração rastreável	Anualmente
Centrífugas	Calibração rastreável ou verificação com um tacômetro independente, conforme apropriado	

APÊNDICE E

Guia sobre validação de equipamentos e verificação de desempenho

Estas informações são fornecidas para fins de orientação e a frequência será baseada na necessidade, tipo e desempenho prévio do equipamento.

TIPO DE EQUIPAMENTO	REQUISITO	FREQÜÊNCIA SUGERIDA
Equipamento com temperatura controlada (incubadoras, banhos, geladeiras, <i>freezers</i>)	(a) Estabelecer estabilidade e uniformidade de temperatura Monitorar a temperatura	(a) Inicialmente, a cada 2 anos e após reparo / modificação Diariamente/ a cada uso
Estufas de esterilização	(a) Estabelecer estabilidade e uniformidade de temperatura Monitorar a temperatura	(a) Inicialmente, a cada 2 anos e após reparo / modificação A cada uso
Autoclaves	(a) Estabelecer características para cargas / ciclos Monitorar a temperatura / tempo	(a) Inicialmente, a cada 2 anos e após reparo / modificação A cada uso
Capelas de segurança	(a) Estabelecer desempenho Monitoração microbiológica Monitoração do fluxo de ar	(a) Inicialmente, a cada ano e após reparo/ modificação Semanalmente A cada uso
Capelas com fluxo laminar de ar	(a) Estabelecer desempenho Verificar com exposição de placas	(a) Inicialmente, e após reparo /modificação Semanalmente
Cronômetro	Verificar com sinal de tempo nacional	Anualmente
Microscópios	Verificar alinhamento	Diariamente / a cada uso
Medidores de pH	Ajustar usando, pelo menos, duas soluções-tampão de qualidade adequada	Diariamente / a cada uso
Balanças	Verificar o zero e a leitura com peso aferidor	Diariamente/a cada uso
Deionizadores e unidades de osmose reversa	(a) Verificar condutividade Verificar contaminação microbiana	(a) Semanalmente Mensalmente

Diluentes gravimétricos	(a) Verificar peso de volume dispensado Verificar relação de diluição	(b) Diária Diária
Dispensadores de meios	Verificar volume dispensado	A cada ajuste ou troca
Pipetadores / pipetas	Verificar exatidão e precisão do volume dispensado	Regularmente (a ser definido, levando em conta a frequência e natureza de uso)
Semeadores em espiral	(a) Estabelecer desempenho com método convencional Verificar estado da cânula e os pontos iniciais e finais Verificar volume dispensado	(a) Inicialmente e anualmente Diariamente/a cada uso Mensalmente
Contador de colônias	Verificar com número contado manualmente	Anualmente
Centrifugas	Verificar velocidade com um tacômetro calibrado e independente	Anualmente
Incubadoras e jarras de anaerobiose	Verificar com indicador anaeróbio	A cada uso
Ambiente de laboratório	Monitorar quanto à contaminação microbiana do ar e das superfícies, usando, por exemplo, amostradores de ar, exposição de placas, placas de contato ou <i>swabs</i> .	Semanalmente

APÊNDICE F

Guia sobre manutenção de equipamentos

Estas informações são fornecidas para fins de orientação e a frequência será baseada na necessidade, tipo e desempenho prévio do equipamento.

TIPO DE EQUIPAMENTO	REQUISITO	FREQUÊNCIA SUGERIDA
(a) Incubadoras (b) Geladeiras (c) <i>Freezers</i> , fornos	Limpar e desinfetar as superfícies internas	(a) Mensalmente (b) Quando necessário (por exemplo: a cada 3 meses) (c) Quando necessário (por exemplo: anualmente)
Banhos-maria	Esvaziar, limpar, desinfetar e repor a água	Mensalmente, ou a cada 6 meses, se usado biocida
Centrífugas	(a) Revisar (b) Limpar e desinfetar	(a) Anualmente (b) A cada uso
Autoclaves	(a) Fazer inspeções visuais da gaxeta, limpar/drenar câmara (b) Revisão completa (c) Verificação de segurança do câmara de pressão	(a) Regularmente, conforme recomendado pelo fabricante (b) Anualmente, ou conforme recomendado pelo fabricante (c) Anualmente
Capelas de segurança Capelas de fluxo laminar	Revisão completa e checagem mecânica	Anualmente ou conforme recomendado pelo fabricante
Microscópios	Serviço completo de manutenção	Anualmente
Medidores de pH	Limpar eletrodo	A cada uso
Balanças, diluentes gravimétricos	(a) Limpar (b) Revisar	(a) A cada uso (b) Anualmente
Destiladores de água	Limpar e remover a crosta	Conforme necessário (por exemplo, a cada 3 meses)

Deionizadores, unidades de osmose reversa	Trocar cartucho / membrana	Conforme recomendado pelo fabricante
Jarras de anaerobiose	Limpar/ desinfetar	Após cada uso
Distribuidores de meios, equipamentos volumétricos, pipetas, e equipamentos para serviços gerais	Descontaminar, limpar e esterilizar, conforme apropriado	A cada uso
Semeadores em espiral	(a) Revisar (b) Descontaminar, limpar e esterilizar	(a) Anualmente (b) A cada uso
Laboratório	(a) Limpar e desinfetar superfícies de trabalho (b) Limpar pisos, desinfetar tanques e pias (c) Limpar e desinfetar outras superfícies	(a) Diária e durante o uso (b) Semanalmente (c) A cada 3 meses

ANVISA

Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública - GGLAS

Galdino Guttmann Bicho

Maria Lúcia Martelli

Carlos Sérgio Melo

Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional

Edição

Gerência de Comunicação Multimídia

Design gráfico

SENAI/DN

Unidade de Tecnologia Industrial - UNITEC

Orlando Clapp Filho

Zeide Lúcia Gusmão Cunha Gomes

Superintendência de Serviços Compartilhados - SSC

Área Compartilhada de Informação e Documentação - ACIND

Marmenha Rosário

Normalização

Cely Curado

Revisão Gramatical