



Acreditação do método de Contagem total de *Staphylococcus coagulase* positiva, de acordo com a NP EN ISO /IEC 17025:2018.

Stéphanie Marlene Pousa do Rosário

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientadores

Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes (ESA-IPB)
Engenheiro José Carlos dos Ramos Nogueiro Martins (LCQA)

Bragança
2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar o meu agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes pela constante motivação e disponibilidade, ao Eng.º José Carlos Martins e a Dr.^a Alexandra Silva, pelo apoio e colaboração para a conclusão deste trabalho;

Em particular, agradeço a toda à minha família, especialmente ao meu marido, pelo amor, compreensão, encorajamento, apoio incondicional e pela paciência sem limite durante todas as fases difíceis;

Á minha querida e linda filha, Gabriela, que amo incondicionalmente e que veio dar um novo sentido à minha vida, espero doravante compensá-la das horas de atenção e brincadeira que lhe devo. Foi ela o meu grande estímulo nesta caminhada;

O meu enorme agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente;

E por fim a Deus, por mais esta oportunidade e por me conduzir em cada momento da minha vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

BIPM - Bureau International des Poids et Mesures

CIPM - Comité Internacional de Pesos e Medidas

EA - European Cooperation for Accreditation

EN – Norma Europeia

FEPTU - Food and Environmental Proficiency Testing Unit

IAPMEI – Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas

ID - Institutos Designados

IEC - International Electrotechnical Commission

ILAC - International Laboratory Accreditation Cooperation

IPAC – Instituto Português da Acreditação

IPQ – Instituto Português da Qualidade

ISO - International Organization for Standardization

LCQA - Laboratório de Controlo e Qualidade Alimentar

LNM - Laboratórios Nacionais de Metrologia

MR – Materiais de Referência

MRA - Acordo de Reconhecimento Mútuo

MRC – Materiais de Referência Certificada

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

UE – União Europeia

UFC's – Unidades Formadoras de Colónias

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

RESUMO

Nos dias de hoje, grande parte dos alimentos são processados e fabricados industrialmente e a troca de alimentos a nível global é cada vez maior, aumentando as probabilidades de contaminação se não forem tomadas as medidas adequadas. De forma a proteger a saúde dos consumidores, existe legislação que obriga as empresas a implementar medidas que garantam a segurança e a qualidade dos seus produtos. A realização de análises microbiológicas a alimentos, águas, superfícies e manipuladores, são essenciais para verificar o cumprimento da legislação, nomeadamente da eficácia da implementação do HACCP, bem como das boas práticas de higiene e das boas práticas de fabrico.

A crescente preocupação dos consumidores relativamente ao consumo de géneros alimentícios seguros e sãos evidencia a importância das análises laboratoriais. Desta forma surge a necessidade de confiança nos resultados analíticos dos laboratórios que a conseguem pela acreditação das suas técnicas. A acreditação serve para um laboratório transmitir ao mercado confiança acrescida, pois este encontra-se organizado segundo princípios e práticas de gestão e de técnicas mais adequados.

Existem vários microrganismos responsáveis por causar doenças de origem alimentar, entre os quais, bactérias do género *Staphylococcus spp.* *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que se encontra presente na flora comensal do Homem e é comumente responsável por várias infeções hospitalares e intoxicações alimentares. As infeções estão associadas à presença da bactéria, sendo esta a causa da patologia, no entanto, as intoxicações alimentares estão associadas a toxinas (produzidas por esta bactéria) presentes nos alimentos.

Pela relevância deste tipo de risco microbiológico nos alimentos, optou-se assim por seleccionar o método da pesquisa e quantificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003, aplicável a géneros alimentícios e alimentos para animais, tendo como objetivo principal a elaboração do processo de acreditação da metodologia analítica de acordo com a NP EN ISO /IEC 17025:2018. Com este trabalho pretende-se nomeadamente implementar o processo da acreditação deste método no Laboratório LCQA.

Palavras-chave: pesquisa e quantificação de *Staphylococcus*, acreditação, metodologia

ABSTRACT

Nowadays, most of the food is processed and manufactured industrially, and global food trade is growing, increasing the likelihood of food contamination, if appropriate measures are not considered. In order to protect consumers' health, companies are required by law to implement measures that ensure the safety and quality of their products. Microbiological analyzes of food, water, surface and food handlers are essential to assess the compliance with legislation requirements, including the effectiveness of HACCP implementation, best hygiene and manufacturing practices.

The increasing awareness of consumers about food safety issues reinforces the importance of laboratorial analysis. In this way, the accreditation of a laboratory assures to the main public that the analytical techniques and results obtained there are trustworthy. Thus, accreditation is a symbol reliability to clients, since the accredited laboratory is following the best principles and management practices, as well as, the more appropriate techniques to the required procedures.

Several microorganisms, such as bacteria of the genus *Staphylococcus* spp., are responsible for foodborne diseases. *Staphylococcus aureus* is a bacterium of the gram-positive coccus group that is present in the commensal flora of humans but is also commonly responsible for various hospital infections and food poisoning. Thus, the presence of these bacteria can cause infections, being the cause of the pathology; however, food poisoning is associated with toxins (produced by these bacteria) present in food.

Due to the relevance of this type of microbiological risk in food, it was decided to use the coagulase-positive *Staphylococcus* counts method, by ISO 6888-2: 1999 / Amd.1: 2003, appropriate to food and feed, to elaborate the accreditation process of the analytical methodology according to NP EN ISO / IEC 17025: 2018. This work intends to implement the process of accreditation of this method at *Laboratório de Controlo Qualidade Alimentar, Lda* (LCQA).

Keywords: enumeration of coagulase-positive staphylococci, accreditation, methodology

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	1
2. CERTIFICAÇÃO E ACREDITAÇÃO	3
2.1. A Certificação.....	3
2.2 A Acreditação	3
2.2.1. Importância da Acreditação	3
2.2.2. Instituto Português de Acreditação (IPAC)	4
2.2.3. Processo de Acreditação	5
2.2.4. Certificado de Acreditação	5
2.2.5. Vantagens da Acreditação	6
2.2.6. Dificuldades da Acreditação	7
3. ACREDITAÇÃO PELA NP EN ISO/IEC 17025	8
3.1. Introdução à Norma	8
3.2. Requisitos da NP EN ISO/IEC 17025	8
3.3. Sistemas de Gestão da Qualidade no Laboratório	25
4. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO	26
5. CASO DE ESTUDO	30
5.1. <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo: <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.2. Princípio do Método de Ensaio	31
5.2.1 Preparação da amostra	31
5.2.2 Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003	31
5.3. Validação do método analítico	33
5.3.1. Metodologia Para Validação do Método de Ensaio	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
Referências Bibliográficas.....	47

ANEXOS

A.1 Instrução de trabalho – Pesquisa e Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	52
A.2 Controlo de qualidade interno - controlo bacteriológico do ar e do ambiente	56
A.3 Procedimento operacional padrão - utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.....	60
A.4 Procedimento operacional padrão - potenciómetro (HI 8424) – utilização, limpeza, manutenção e calibração.	64
A.5 Instrução de trabalho - controlo e preparação de meios de cultura.	67
A.6 Instrução de trabalho - reconstituição de culturas de referência.....	74
A.7 Ficha de avaliação de formação.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação da competência técnica (Fonte: IPAC, 2018).....	4
Figura 2 - Etapas do processo de Acreditação pelo IPAC (Fonte: IPAC, 2018).....	5
Figura 3 - Anexo Técnico e Símbolos de Acreditação (Fonte: IPAC, 2018).....	6
Figura 4 – Aspeto geral da entrada do LCQA	
Figura 5 – Zona de Preparação de Meios de Cultura	27
Figura 6 - Parte da Sala de Microbiologia	
Figura 7 - Zona de Incubação	27
Figura 8 - Zona das Confirmações e Repicagens	
Figura 9 - Sala de Lavagem de material, Esterilização e Descontaminação	27
Figura 10 - Esquema representativo da metodologia de ensaio de pesquisa e quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Requisitos dos Recursos e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018.....	9
Tabela 2 - Requisitos dos Processos e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018.....	14
Tabela 3 - Requisitos do Sistema de Gestão e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018	22
Tabela 4 - Exemplos de requisitos e periodicidade para a manutenção do equipamento (Relacre, 2007).	38
Tabela 5 – Exemplos de calibração e verificação de calibração de equipamentos (Relacre, 2007).	39
Tabela 6 – Exemplos de validação do equipamento e verificação do funcionamento (Relacre, 2007).	40
Tabela 7 - Controlo de qualidade positivo e negativo para os meios de cultura.	42
Tabela 8 - Resultados obtidos dos ensaios interlaboratoriais realizados no LCQA, para os anos 2011 a 2014	44

1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

A inocuidade dos alimentos e a sua regulamentação são hoje motivo de grande preocupação nacional e internacional. As doenças de origem alimentar constituem um problema grave pois estão na origem de custos inportáveis e de prejuízos económicos maciços. A WHO estima que as doenças transmitidas pelos alimentos e pela água causem elevada morbidade e mortalidade. Estas doenças são provocadas por vários agentes patogénicos, tais como bactérias, parasitas, vírus, toxinas e resíduos químicos. Segundo a EFSA, as doenças de origem alimentar são um grave, e crescente, problema de Saúde Pública, sendo que na União Europeia são reportados cerca de 320 000 casos por ano, acreditando-se que este número terá tendência a aumentar.

Os alimentos são, na sua maioria, excelentes meios de cultura para o desenvolvimento de microrganismos que, dependendo do microrganismo em causa e da multiplicação bacteriana, podem causar deterioração do alimento e/ou risco para a Saúde Pública. O desenvolvimento de microrganismos no alimento vai depender das características do próprio produto, ou seja, fatores intrínsecos (pH, a atividade da água, os nutrientes disponíveis, constituintes antimicrobianos e estruturas biológicas) e fatores extrínsecos (como a temperatura ambiente e a humidade relativa). Estes fatores são importantes uma vez que vão potenciar, ou não, o crescimento microbiano, no produto alimentar (Institute of Food Technologists. 2004; Novais, 2010).

Na tentativa de reduzir o número de casos de doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados, têm sido implementadas medidas de monitorização dos alimentos, encorajando todos os sectores ligados ao manuseamento de alimentos a melhorar a higiene e a incorporar sistemas de segurança alimentar, como o HACCP.

Os princípios e práticas exigidas ao nível de segurança alimentar estão integrados no sistema da qualidade, mais precisamente no âmbito do controlo da qualidade das empresas. É expectável que uma empresa alimentar tenha o sistema de HACCP como parte integrante do seu sistema de gestão da qualidade, mais ainda porque a sua implementação facilita o cumprimento das exigências legais. O HACCP é um sistema mundialmente conhecido, caracterizado como tendo uma abordagem antecipada e preventiva de perigos biológicos, químicos e físicos, detetando os problemas antes que ocorram ou no momento em que ocorrem (Al-Kandari, and Jukes, 2011). Segundo Raszl (2001), o sistema HACCP, baseia-se numa série de etapas inter-relacionadas, inerentes ao processamento industrial de alimentos, que inclui todas as operações, desde a produção primária até ao consumo. Incidentes relacionados com a Segurança Alimentar, demonstram que o controlo inadequado ao longo da cadeia de produção prejudica o consumidor, mas também as organizações envolvidas.

Sendo a contaminação dos alimentos por microrganismos patogénicos uma questão de Saúde Pública, conforme já mencionado, torna-se necessário o estabelecimento de processos de monitorização, frequência de amostragem e análise dos alimentos e da água, em função dos perigos

e riscos decorrentes, e de acordo com a legislação em vigor. Nesse sentido, o recurso a programas sistemáticos de controlo de qualidade microbiológica, aplicados à manipulação, processamento, transporte, armazenamento e distribuição dos alimentos, mostrou ser uma das vias mais eficazes de controlo e prevenção sanitária. Por outro lado, o conhecimento e o estabelecimento, dos métodos a utilizar para determinação de cada parâmetro é, atualmente, um requisito indispensável.

Nesse contexto, este trabalho aborda a acreditação de metodologias analíticas de acordo com a NP EN ISO /IEC 17025:2018, nomeadamente analisando a metodologia a implementar para a acreditação do método de Quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003. O trabalho foi desenvolvido no laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas de águas e produtos alimentares, Laboratório de Controlo Qualidade Alimentar, Lda (LCQA), situado em Bragança. Pretende-se com este trabalho contribuir para o processo de implementação da NP EN ISO/IEC 17025 no LCQA, já que a acreditação de ensaios é um fator de posicionamento de mercado e uma vantagem competitiva. Assim, foram elaborados vários documentos que demonstram a implementação do método de Quantificação de *Staphylococcus aureus*, em cumprimento com as características de desempenho do mesmo e em conformidade com os requisitos da NP EN ISO /IEC 17025:2018 .

Esta tese encontra-se organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento do estudo realizado e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo trata-se do tema da certificação da qualidade e acreditação, tendo como referenciais a norma ISO 17025, os seus objetivos, vantagens, dificuldades e impacto nas organizações. No terceiro capítulo, a fim de estudar em concreto a acreditação e a sua importância na competência de laboratórios de calibração e ensaios, efetua-se uma descrição dos requisitos gerais para a acreditação e procedeu-se a uma revisão detalhada da norma internacional NP EN ISO /IEC 17025. No quarto capítulo é dado destaque à caracterização do laboratório LCQA. No quinto capítulo é apresentado o caso de estudo, pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003, bem como se detalha a metodologia de implementação e discutidas as evidências necessárias para a validação do método. No último capítulo são sintetizadas as principais conclusões alcançadas neste estudo e finalmente é apresentada a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

2. CERTIFICAÇÃO E ACREDITAÇÃO

2.1. A Certificação

"Certificar consiste em demonstrar a conformidade das características de um produto, serviço ou sistema face a um documento de referência preciso que estabeleça e quantifique os parâmetros que devem ser verificados. O processo de certificação de uma empresa consiste na conceção, criação, implementação e certificação de um Sistema da Qualidade, conforme a um Modelo de Garantia da Qualidade adequado" (IAPMEI, 2018).

"A Acreditação e a Certificação de Sistemas de Gestão são atividades que se diferenciam quer quanto aos objetivos quer quanto aos respetivos referenciais. A certificação (de sistemas de gestão, de produtos, de pessoas) é uma das atividades de avaliação da conformidade (certificação, inspeção, ensaio, calibração). A acreditação é o reconhecimento da competência técnica para exercer as atividades de avaliação da conformidade" (IPAC, 2018).

Deve ficar claro que a acreditação se diferencia da certificação em vários outros aspetos, nomeadamente nos critérios e metodologias usadas, bem como por haver apenas uma entidade acreditadora, o IPAC, a qual efetua a regulação dos organismos de certificação.

2.2 A Acreditação

2.2.1. Importância da Acreditação

No que diz respeito aos laboratórios de calibração e de ensaios, a disponibilidade do sistema da qualidade constitui indicação necessária, mas não suficiente, já que também é imprescindível demonstrar a competência técnica do laboratório. Em consonância com as práticas internacionais, torna-se indispensável mostrar aos clientes e usuários dos serviços do laboratório que os certificados de calibração e os relatórios de ensaios são metrologicamente confiáveis. Relativamente à formalização da credibilidade laboratorial o instrumento a ser adotado não deve ser a certificação ISO 9001 do Sistema da Qualidade do laboratório, mas sim a sua acreditação pelo referencial ISO 17025, uma vez que esta, além do Sistema da Qualidade, também atesta a competência do laboratório.

Assim, a base para a acreditação de métodos de ensaio e/ou de calibração de um laboratório é a norma internacional ISO/IEC 17025, utilizada quer a nível internacional, quer a nível nacional. Dado que a nível mundial é seguida a mesma norma para a acreditação de métodos de ensaio e/ou calibração de laboratórios, esta uniformidade tem proporcionado que diferentes países estabeleçam entre si acordos baseados na avaliação e aceitação mútua dos sistemas de acreditação de cada um deles (Soares, 2010).

Hoje em dia as empresas são mais exigentes e um factor selecionador dos serviços prestados por laboratórios é o facto de este ter métodos de ensaio acreditados. Assim, os laboratórios que

pretendem estar no mercado e pretendem garantir ao cliente a confiança nos resultados dos ensaios produzidos, bem como o reconhecimento da sua competência, têm de ter a capacidade de inovação e de mudança para responder às necessidades do mercado, ou seja, para além de terem competência técnica têm de ser capazes de o evidenciar, através do reconhecimento pelo IPAC (Soares, 2010).

Os trabalhos efetuados por um laboratório com métodos de ensaio normalizados e/ou acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo a NP EN ISO/IEC 17025, oferecem maior confiança e têm maior credibilidade (Santos, 2008). A Acreditação serve essencialmente para ganhar e transmitir confiança na execução de determinadas atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnica mínimo, reconhecido internacionalmente.

2.2.2. Instituto Português de Acreditação (IPAC)

A atividade de acreditação está sujeita a legislação comunitária que obriga a um funcionamento harmonizado, verificado através de um sistema de avaliação pelos pares. Em consequência, cada Estado-Membro da União Europeia designou um único organismo nacional de acreditação, tendo em Portugal (Figura 1) essa missão sido atribuída ao Instituto Português de Acreditação (IPAC), conforme estabelecido na sua lei orgânica (Decreto-Lei n.º 81/2012, de 27 de março) e no Decreto-Lei n.º 23/2011 de 11 de fevereiro.

Assim, o Instituto Português de Acreditação, (IPAC) é o organismo nacional de acreditação requerido pelo Regulamento (CE) n.º 765/2008, conforme detalhado na secção Acreditação. Os serviços de acreditação prestados pelo IPAC estão descritos no Regulamento Geral de Acreditação e Procedimentos conexos, bem como as regras, critérios e metodologias aplicáveis.

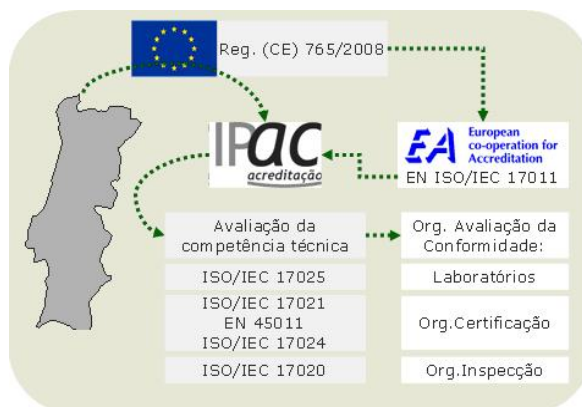


Figura 1 - Avaliação da competência técnica (Fonte: IPAC, 2018).

O IPAC é membro da infraestrutura europeia de acreditação, a *European cooperation for Accreditation* (EA), bem como das estruturas mundiais de acreditação, a *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC) e o *International Accreditation Forum* (IAF), conforme se indica na secção Reconhecimento Internacional (<http://www.ipac.pt/ipac/recint.asp>).

Em termos orgânicos, o IPAC é dirigido por um Conselho Diretivo e possui uma organização simplificada em que os serviços de apoio, nomeadamente serviços financeiros, de informática, de

recursos humanos e logísticos, são subcontratados externamente. Para o desenvolvimento das suas atividades de acreditação o IPAC possui diversas comissões técnicas em que interatua com as partes interessadas e recorre a uma bolsa de avaliadores e peritos externos. Possui ainda uma Comissão Consultiva representativa das várias partes interessadas na atividade de acreditação e que supervisiona a imparcialidade da sua atuação, bem como providencia orientação estratégica.

2.2.3. Processo de Acreditação

De acordo com o IPAC, o processo de acreditação é regido por normas internacionais, de modo a permitir a existência de Acordos de Reconhecimento Internacionais e o cumprimento do Regulamento (CE) 765/2008 (Figura 1). O processo está descrito em detalhe no Regulamento Geral de Acreditação (DRC001) e começa pela apresentação de uma candidatura pela Entidade, devendo para tal preencher e enviar ao IPAC os formulários correspondentes à atividade técnica que pretende desempenhar. A candidatura é de seguida analisada pelo IPAC para verificar se está completa e se pode ser dada sequência. Durante a fase de avaliação o IPAC nomeia a Equipa Avaliadora, a qual estuda a documentação e procede à avaliação, após o que é emitido um Relatório, identificando as deficiências a serem corrigidas para demonstrar o cumprimento das normas de acreditação. A Entidade irá responder, a Equipa Avaliadora estuda e emite um parecer, a que se segue uma análise de todo o processo pelo IPAC – se aplicável, é solicitado um parecer às entidades regulamentares. É então tomada uma decisão pelo IPAC, que sendo favorável, irá desencadear o ciclo anual seguinte (Figura 2).

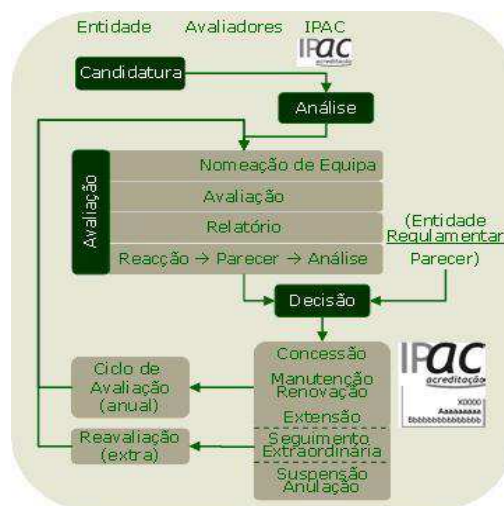


Figura 2 - Etapas do processo de Acreditação pelo IPAC (Fonte: IPAC, 2018).

2.2.4. Certificado de Acreditação

A acreditação é a evidência da competência dos laboratórios. Um laboratório com ensaios acreditados consiste num laboratório que comprovadamente possui os recursos humanos, equipamentos, métodos, instalações e procedimentos laboratoriais necessários para, “produzir”

resultados que cumprem os requisitos dos clientes e os requisitos de boas práticas aplicáveis. Um ensaio acreditado corresponde ao topo da hierarquia da Qualidade. A acreditação é evidenciada através de um Certificado de Acreditação onde é descrito em pormenor o âmbito da acreditação (que pode ou não abranger todas as actividades que a entidade exerce). Cada Certificado de Acreditação tem um número de registo inequívoco (Xnnnn), que é repetido no correspondente símbolo de acreditação (Figura 3).

As entidades acreditadas podem ser reconhecidas pelo uso do símbolo de Acreditação nos documentos relativos à(s) atividade(s) acreditada(s), conforme a figura 3. A utilização dos símbolos de Acreditação é obrigatória nos documentos resultantes das atividades acreditadas (como relatórios e certificados) e facultativa noutros documentos associados à realização das mesmas (como orçamentos, faturas, brochuras). O certificado tem uma validade de três anos, sendo, contudo, os laboratórios auditados anualmente.



Figura 3 - Anexo Técnico e Símbolos de Acreditação (Fonte: IPAC, 2018).

2.2.5. Vantagens da Acreditação

Ainda que as vantagens associadas à acreditação já tenham sido indiretamente mencionadas, importa salientar que as vantagens podem ser de ordem organizacional, técnicas, éticas e ainda de mercado (Almeida e Pires, 2006).

- ✓ Vantagens organizacionais: o sistema de gestão da qualidade sofre uma constante revisão e existe uma maior disciplina no trabalho de gestão, contribuindo para a sustentabilidade da empresa;
- ✓ Vantagens técnicas: a acreditação exige que um laboratório possua pessoal competente, instalações e equipamento adequado, métodos de ensaio e/ou calibração validados e revisões constantes dos procedimentos. Desta forma, existe uma maior garantia da qualidade dos resultados;

- ✓ Vantagens éticas: existe uma maior imparcialidade no processo de obtenção dos resultados, uma vez que, o modo de trabalho proporciona critérios de decisão como também existe a garantia de confidencialidade dos resultados;
- ✓ Vantagens de mercado: relaciona-se com a imagem de qualidade que o laboratório transmite como também a capacidade de resposta que o laboratório possui a um mercado mais exigente.

2.2.6. Dificuldades da Acreditação

Contudo, a todo o processo de acreditação estão associadas algumas dificuldades relativas às exigências mínimas de implementação dos requisitos da NP EN ISO/IEC 17025:2018. A implementação de um sistema da qualidade envolve custos elevados, sendo este factor, o mais evidente na fase inicial do processo. Estes custos estão associados à necessidade de pessoal qualificado, instalações adequadas, auditorias, ensaios interlaboratoriais e equipamentos adequados e calibrados, entre outros.

Outra das dificuldades que surge é a relativa ao excesso de documentação produzido. Devido às exigências da norma, o laboratório tende a produzir um volume significativo de documentação, podendo dificultar o bom funcionamento do laboratório (Almeida e Pires, 2006). Apesar de, com a prática, o volume de documentação tender a diminuir, o mesmo não pode ser evitado, já que se trata do mecanismo que por excelência permite evidenciar o Sistema da Qualidade.

Após a implementação da NP EN ISO/IEC 17025:2018 existe uma maior subcarga de trabalho, no sentido de verificar se as operações continuam a satisfazer os requisitos do normativo e se porventura existir alguma falha é necessário garantir que esta será rapidamente resolvida (Almeida e Pires, 2006).

As dificuldades sentidas pelos laboratórios dependem sobretudo do tipo de atividade que é exercida, isto é, os requisitos técnicos, as infraestruturas, o *layout* e o equipamento serão diferentes e requerem maior ou menor esforço para as diferentes atividades.

3. ACREDITAÇÃO PELA NP EN ISO/IEC 17025

3.1. Introdução à Norma

A ISO/IEC 17025 é uma norma destinada a laboratórios de ensaio e calibração que queiram demonstrar sua competência. Publicada pela primeira vez em 1999 e atualizada em 2005 e em 2018, a ISO/IEC 17025 é utilizada como referência para laboratórios de ensaio e calibração. O processo de revisão que teve início em 2015, reuniu profissionais e especialistas de mais de 50 países e foi aprovado pela quase totalidade dos membros da ISO (90%) e da IEC (100%). Entre as principais novidades da nova edição, destacam-se (Relacre, 2017; Santos, 2017):

- Uma nova estrutura desenvolvida pelo *Committee on Conformity Assessment/ Working Group 44* (CASCO/WG 44) e compartilhada por todas as normas voluntárias relacionadas ao processo de avaliação de conformidade;
- O uso de novas tecnologias, principalmente para a geração de resultados e relatórios electrónicos;
- Recomendações para o desenvolvimento de um sistema de gestão específico para os laboratórios, e não baseado apenas na qualidade;
- Novos requisitos a partir da versão de 2015 da ISO 9001, envolvendo a abordagem de processos e o *conceito de risco*;
- Recomendações para a emissão de relatórios sobre os resultados da amostragem;
- Vocabulário atualizado, em linha com as atuais práticas laboratoriais.

Os laboratórios podem agora utilizar uma norma de referência atualizada, de acordo com as mudanças na indústria, envolvendo tanto as organizações quanto os recursos e processo que estes devem implementar. Para os laboratórios, é uma excelente forma de se destacarem da concorrência, para os consumidores, é um sinal de que o trabalho será conduzido da maneira mais detalhada possível, gerando resultados mais transparentes e confiáveis.

3.2. Requisitos da NP EN ISO/IEC 17025

As Normas Internacionais com requisitos de qualidade para laboratórios têm o mesmo intuito, garantir que os resultados obtidos nos laboratórios que trabalham segundo as mesmas normas, são de elevada qualidade (Wallin, 1996). Para cumprirem com uma norma de qualidade os laboratórios necessitam, entre outras medidas, de implementar um sistema de qualidade apropriado ao tipo, à gama e ao volume de trabalho que realizam, de documentar as medidas de qualidade no Manual da Qualidade do laboratório e os métodos de ensaio utilizados têm que estar validados (Wallin, 1996).

Além disso, o cumprimento dos requisitos da Norma NP EN ISO/IEC 17025 facilita a aceitação dos resultados dos ensaios e calibrações entre países, permitindo também a cooperação entre laboratórios e outros organismos, a partilha de informação e experiência e a harmonização de normas e procedimentos.

A Norma NP EN ISO/IEC 17025:2018 atualmente está dividida em cinco secções, englobando os Requisitos de Gestão, os Requisitos dos Recursos e os Requisitos dos Processos. Assim, para além do ponto 1 a 3 (1. Objetivo e campo de aplicação, 2. Referências normativas, 3. Termos e definições) salientam-se os pontos 4. Requisitos gerais, 5. Requisitos de estrutura, 6. Requisitos dos recursos, 7. Requisitos dos processos e 8. Requisitos do sistema de gestão. Assim, se o laboratório cumprir todos os requisitos presentes na Norma também irá satisfazer os requisitos da Norma NP EN ISO 9001.

Para melhor compreensão, apresentam-se as principais alterações introduzidas na 3ª edição da ISO/IEC 17025, face à edição anterior, nomeadamente na tabela 1, onde são apresentados os Requisitos dos Recursos (subsecção 6.1 a 6.6).

Tabela 1 - Requisitos dos Recursos e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018

Subsecção da Norma	Requisitos dos Recursos	Principais alterações
6.1	Generalidades	--
6.2	Pessoal	<ul style="list-style-type: none"> •Relação entre competência e responsabilidades mais explícita •Eliminadas disposições relativas às necessidades de formação
6.3	Instalações e condições ambientais	<ul style="list-style-type: none"> •Introdução da análise periódica das medidas de controlo das instalações (não dos resultados, mas das medidas em si)
6.4	Equipamento	<ul style="list-style-type: none"> •Conceito de equipamento alargado (materiais de referência, <i>software</i>) •Foco no acesso ao equipamento e não na posse
6.5	Rastreabilidade metrológica	<ul style="list-style-type: none"> •Aplicação a ensaios metrológicos e funcionais a equipamentos
6.6	Produtos e serviços de fornecedores externos	<ul style="list-style-type: none"> •Fusão aprovisionamentos e subcontratação. Eliminada a necessidade de política •Introdução da necessidade de comunicação relativa a vários elementos. •Eliminado o documento de compra

Subsecção 6.2 – Pessoal

Todo o pessoal do laboratório, interno ou externo, que possa influenciar as atividades de laboratório, deve agir com imparcialidade, ser competente e trabalhar de acordo com o sistema de gestão do laboratório. O laboratório deve documentar os requisitos de competência para cada

função, incluindo os requisitos de formação, qualificação, treino, conhecimento técnico, habilidades e experiência. Considera-se que, para garantir a competência do pessoal, devem estar definidas num documento as qualificações mínimas exigíveis para os diferentes cargos/postos de trabalho/funções do laboratório. Por exemplo, o Responsável Técnico (RT) deve ter experiência profissional adequada e suficiente na respetiva área técnica para o desempenho da função e recomenda-se que possua licenciatura nas áreas de atividade técnica do laboratório (Guia IPAC-17025:2005).

Deve ser assegurado que o pessoal tenha competência para realizar as atividades de laboratório pelas quais é responsável e para avaliar a importância dos desvios. A gerência do laboratório deve comunicar ao pessoal os seus deveres, responsabilidades e autoridades.

Nesse contexto, o laboratório deve ter procedimento(s) e manter registos para:

- Determinação dos requisitos de competência;
- Seleção de pessoal;
- Formação de pessoal;
- Supervisão de pessoal;
- Autorização de pessoal;
- Monitoramento da competência de pessoal.

Os métodos de demonstração de competência deverão ser proporcionais e apropriados à capacidade em avaliação – a demonstração de tipos de competências distintas (educação, qualificação, formação, conhecimentos técnicos, perícias, experiência), e normalmente exige a aplicação de métodos também distintos. A demonstração de perícia e conhecimento técnico pode ser feita através da realização periódica de testes práticos e/ou teóricos de desempenho, comparações intralaboratoriais com pessoal mais experiente ou qualificado ou participação em comparações interlaboratoriais. Recomenda-se que pelo menos anualmente seja demonstrada a perícia e o conhecimento técnico do pessoal na realização das atividades laboratoriais (ensaios, calibrações e amostragem). Também podem ser usados métodos como a análise de registos (por exemplo currículos ou registos de realização da atividade), o retorno de informação (e.g. de antigos empregadores ou clientes), entrevistas e observações no local (Guia IPAC-17025:2018).

Subsecção 6.3 – Instalações e Condições Ambientais

Sempre que o controlo das condições ambientais seja necessário, o equipamento de medição utilizado para o efeito deve ser adequado ao uso, estar calibrado e disponível. O controlo pode ser efetuado continuamente ou pontualmente, p.e. aquando da realização da atividade laboratorial (Guia IPAC-17025:2018). A boa qualidade bacteriológica do ar e das superfícies é imprescindível para o controlo de qualidade nos laboratórios de microbiologia, já que pode interferir com os resultados

analíticos obtidos. Assim, periodicamente a detecção da contaminação microbiana das superfícies e ar ambiente deve ser feita como evidência do cumprimento dos requisitos.

Subsecção 6.4 – Equipamento

Os equipamentos utilizados em ensaios e/ou calibrações, devem ser calibrados ou verificados, de modo a demonstrar que cumprem os requisitos específicos do laboratório e as especificações normativas relevantes. Quando sujeitos a calibração ou verificação, os equipamentos devem ser etiquetados e a etiqueta deve indicar a data da última e da próxima calibração ou verificação.

O referido equipamento deve ser utilizado pelo pessoal do laboratório, que deve ter à sua disposição instruções actualizadas sobre a utilização e manutenção do equipamento, bem como ter acesso ao manual de instruções em português fornecido pelo fabricante.

Para controlo da operacionalidade do equipamento devem ser definidos:

- programas de calibração para as principais grandezas ou valores dos instrumentos, sempre que estas propriedades tenham impacto significativo sobre o resultado.
- mecanismos para calibrar ou verificar o equipamento antes de ser colocado ao serviço, por exemplo evidenciado com etiqueta colada no equipamento. (Soares, 2010).

Devem ser mantidos registos de equipamentos que possam influenciar as atividades de laboratório, devendo incluir (Guia IPAC-17025: 2018):

- Nome do equipamento, software e do fabricante, versão do software, modelo e outras identificações unívocas;
- Evidência de verificação de que o equipamento está conforme com os requisitos especificados;
- Localização atual;
- Datas e resultados de calibrações, ajustes, critérios de aceitação e data prevista da próxima calibração ou intervalo de calibração;
- Documentação de materiais de referência, resultados, critérios de aceitação, data pertinente de período de validade;
- Plano de manutenção e manutenções realizadas até o momento;
- Detalhes de qualquer dano, mau funcionamento, modificação ou reparo do equipamento.

Para garantir o funcionamento adequado do equipamento, deve estar documentado como efetuar em segurança o manuseamento, transporte, armazenamento, utilização e manutenção previstas do equipamento de medição.

Um equipamento é considerado fora do controlo permanente do laboratório quando for cedido temporariamente para uso por pessoas externas ao laboratório (por exemplo: para investigação, formação ou partilha com outro departamento da entidade) ou quando for usado um equipamento externo a que o laboratório recorra temporariamente, em situações de exceção (por exemplo: avaria ou acidente).

O laboratório deve definir a metodologia para a utilização de equipamento fora do seu controlo permanente, nomeadamente quanto a:

- Condições de cedência e utilização do equipamento;
- Condições de acesso às instalações onde se encontra o equipamento;
- Registo de uso do equipamento nessas condições. (Guia IPAC-17025).

Um equipamento que esteve fora do seu controlo deve garantir que os seus estados de funcionamento e calibração sejam verificados e demonstrados como satisfatórios antes do equipamento ser colocado ao serviço.

Subsecção 6.5 – Rastreabilidade metrológica

O laboratório deve estabelecer e manter a rastreabilidade metrológica dos seus resultados de medição, por meio de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição, relacionando-os a uma referência apropriada.

As calibrações podem ser efectuadas externamente ao laboratório (calibração externa), em entidades competentes, ou internamente no laboratório (calibração interna).

Os certificados de calibração emitidos por laboratórios externos, que possam demonstrar competência, capacidade de medição e rastreabilidade, devem apresentar os resultados da medição, incluindo a incerteza de medição e/ou declaração de conformidade com uma especificação metrológica identificada.

Para efeitos de calibração externa consideram-se como entidades competentes (Guia IPAC-17025: 2018):

- Laboratórios que estejam acreditados pelo IPAC para executar essa calibração e que são identificados pela aposição do respectivo Símbolo de Acreditação nos certificados emitidos;
- Laboratórios que estejam acreditados para executar essa calibração por um dos organismos de acreditação signatários do Acordo Multilateral da EA ou ILAC e que são identificados pelo respectivo logotipo de acreditação;

- Laboratórios Nacionais de Metrologia (LNM) ou Institutos Designados (ID), de países cujos organismos de acreditação sejam signatários do Acordo Multilateral da EA ou ILAC, ou LNM/ID que participem nas comparações-chave do BIPM ou de organizações regionais de metrologia (por exemplo: EURAMET), ou que sejam membros do respectivo Acordo de Reconhecimento Mútuo (MRA) do CIPM.

Não são aceites Certificados de Calibração ou outros documentos com o mesmo fim emitidos por outros organismos, nomeadamente, fabricantes ou empresas (mesmo com certificação ISO 9001).

Como situações de exceção, para quando não existam capacidades de calibração por entidades competentes (nacionais ou estrangeiras), serão aceites calibrações por outras entidades, desde que o laboratório seja acreditado em áreas de calibração afins.

Considera-se que as calibrações internas devem cumprir requisitos idênticos aos de um laboratório de calibração acreditado. Assim, quando efetuadas pelo próprio laboratório devem estar disponíveis para serem auditadas no decorrer da avaliação ao mesmo, podendo para o efeito o IPAC introduzir um ou mais elementos adicionais na Equipa Avaliadora.

Ainda à semelhança dos laboratórios de calibração acreditados, devem participar em comparações interlaboratoriais reconhecidas pelo IPAC, nas áreas técnicas sujeitas a calibração interna, podendo igualmente serem realizadas Auditorias de Medição, quando necessário (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 6.6 – Produtos e serviços de fornecedores externos

Recomenda-se que os serviços de ensaio, calibração e amostragem, cujos resultados se destinam a fornecer diretamente ao cliente, sejam contratados a laboratórios acreditados para o efeito. A avaliação de fornecedores pode envolver, por exemplo, a realização de auditorias pelo laboratório.

As conclusões sobre a avaliação de fornecedores devem ser feitas por tipo de produtos e tipo de serviços. São exemplos de critérios de avaliação de fornecedores: qualidade dos serviços, qualidade dos produtos, prazo de entrega, certificação ou acreditação, consoante aplicável.

O laboratório deve avaliar todos os fornecedores relevantes, mesmo no caso de fornecedores únicos, a fim de poder manifestar a sua satisfação e medir a evolução, e também poder comparar quando houver mais fornecedores (Guia IPAC-17025:2018).

Na tabela 2 apresentam-se as principais alterações introduzidas na ISO/IEC 17025, face à edição anterior, no que diz respeito aos Requisitos dos Processos (subsecção 7.1 a 7.11).

Tabela 2 - Requisitos dos Processos e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018.

Subsecção da Norma	Requisitos dos Processos	Principais alterações
7.1	Análise de consultas, propostas e contratos	<ul style="list-style-type: none"> Emissão de declarações de conformidade com base na regra de decisão definida e acordada em sede de contrato com o cliente.
7.2	Seleção, verificação e validação de métodos	<ul style="list-style-type: none"> Melhor sistematização terminológica
7.3	Amostragem	-
7.4	Manuseamento de itens de ensaio ou calibração	-
7.5	Registos técnicos	-
7.6	Avaliação de incerteza de medição	<ul style="list-style-type: none"> Contribuição da incerteza da amostragem para a estimativa do cálculo da incerteza do método
7.7	Assegurar a validade dos resultados	<ul style="list-style-type: none"> Atualização dos exemplos de ferramentas de controlo da qualidade Obrigatória participação em ensaios de aptidão ou outras comparações interlaboratoriais Releva política ILAC
7.8	Apresentação dos resultados	<ul style="list-style-type: none"> Revisão de resultados Informação fornecida pelo cliente Incerteza/Incertezas na amostragem Amostragem na calibração Regra de decisão e risco associado Identificação de alterações nas emendas aos relatórios
7.9	Reclamações	<ul style="list-style-type: none"> Processo de tratamento disponível Elementos a incluir no processo Independência na decisão, ou revisão e aprovação Notificar encerramento junto do reclamante
7.10	Trabalho não conforme	<ul style="list-style-type: none"> Eliminada a necessidade de política
7.11	Controlo de dados e gestão da informação	<ul style="list-style-type: none"> Fornecedores externos de sistemas de informação Avaliação de fornecedores externos

Subsecção 7.1 – Análise de consultas, propostas e contratos

Aqui estabelecem-se as regras gerais para análise das consultas e/ou pedidos de trabalho remetidos pelo cliente, registo, análise e emissão de respostas, propostas ou contratos, conforme os casos.

Na análise da consulta são tidos em conta as capacidades do laboratório, adequabilidade dos métodos a seguir, recursos e pessoal. Deve ser definida uma política de prazos de resposta e de preços. O modelo de resposta deve identificar as normas, métodos e/ou procedimentos de ensaio, local de realização dos ensaios, locais de receção dos itens para ensaio, ou recolha da amostra

quando aplicável, prazos de resposta, preço, modo de devolução dos itens ensaiados e modo de entrega dos resultados dos ensaios. Convém ter mecanismos que permitam a devolução de itens ensaiados aos clientes (para quando o solicitarem) e estabelecer um prazo máximo para devolução da amostra e informar previamente o cliente sempre que a quantidade ou perecibilidade da amostra inviabilize a sua devolução.

A realização do trabalho concretiza-se após a celebração de um contrato que pode ser, ou não, passado a escrito e que formaliza o acordo com base na consulta e na resposta emitida. No contrato podem ser contemplados aspetos comerciais, legais, de confidencialidade e/ou outros que se justifiquem no âmbito da negociação.

Os registos devem contemplar todos os aspetos relevantes incluindo prazos de entrega de resultados, preços, recurso a fornecedores de serviços de ensaio (ou calibração ou amostragem) externos e responsabilidade pela amostragem (Guia IPAC-17025:2018).

Subsecção 7.2 – Métodos de Ensaio e Calibração e Validação de Métodos

O laboratório deve definir os ensaios e/ou calibrações que pretende incluir no âmbito da acreditação, segundo o formato e instruções dispostas nos formulários de candidatura do IPAC. Os ensaios/calibrações do âmbito da acreditação do laboratório são referidos como *ensaios/calibrações acreditados* e os fora do âmbito como *ensaios/calibrações não acreditados* (IPAC, 2010).

Dentro do seu âmbito de atividade, o laboratório deve utilizar métodos e procedimentos adequados para a realização dos ensaios/calibrações que devem incluir a amostragem, manuseamento, transporte, armazenamento e preparação dos itens a ensaiar/calibrar e, quando adequado, a determinação da estimativa da incerteza da medição, bem como técnicas estatísticas para análise dos dados de ensaios/calibrações. Para cumprimento deste requisito o laboratório deve evidenciar experiência prática na realização de ensaios/calibrações segundo os métodos que pretende acreditar ou para os quais está acreditado, a fim de permitir avaliar e comprovar a competência e a familiarização com os mesmos. (IPAC, 2010)

Nesse contexto, o laboratório deve:

- Ter instruções sobre a utilização e funcionamento do equipamento
- Ter instruções sobre o manuseamento e preparação dos itens a ensaiar/calibrar
- Manter atualizados e de fácil acesso ao pessoal todas as instruções, normas, manuais e dados de referência relevantes para o trabalho do laboratório.
- Permitir que ocorram desvios aos métodos de ensaio e/ou calibração se estiverem documentados, tecnicamente justificados, autorizados e aceites pelo cliente.

O laboratório deve utilizar de preferência métodos publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, que satisfaçam as necessidades do cliente e que sejam adequados para os ensaios/calibrações que realiza. A NP EN ISO/IEC 17025 considera ser necessário completar a

norma de ensaio/calibração com pormenores adicionais, que podem estar descritos, por exemplo, em documentos controlados, anexos à norma de ensaio/calibração, ou em procedimentos internos. Caso o documento normativo seja pouco claro, e permita interpretações diferentes, nomeadamente a aspetos que afetam a qualidade do ensaio/calibração, o laboratório deve definir e descrever a sua interpretação (Soares, 2010).

O laboratório deve registar os resultados obtidos, o procedimento utilizado para a validação e uma declaração quanto à adequação do método para a utilização pretendida.

A estimativa da incerteza dos resultados é um requisito da NP EN ISO/IEC 17025, devendo o laboratório identificar todos os componentes da incerteza e fazer uma estimativa que garanta que o modo de apresentação dos resultados não dê uma ideia errada da incerteza (Silvério & Barros, 2002).

Validação de métodos:

O facto de se realizar um ensaio/calibração de acordo com um método normalizado não dispensa a evidência de registos que demonstrem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do mesmo.

Recomenda-se que a validação de métodos seja adaptada a cada caso, sendo progressivamente mais exigente e exaustiva para as situações sucessivamente indicadas (Guia IPAC-17025:2018):

1. Método normalizado;
2. Uma modificação menor da técnica, do equipamento ou do tipo de produto a ensaiar relativamente a uma norma (ou documento normativo) existente;
3. Uma modificação maior da técnica e/ou equipamento e/ou tipo de produto a ensaiar relativamente a uma norma (ou documento normativo) existente;
4. Método baseado em técnicas de ensaio/calibração ou medição conhecidas, cuja aplicação ao ensaio/calibração pretendida venha descrita em literatura científica, não existindo norma de ensaio/calibração correspondente;
5. Método baseado em técnicas de ensaio/calibração ou medição conhecidas, mas cuja aplicação ao ensaio/calibração pretendida não venha descrita na literatura científica;
6. Método baseado em técnicas (ou princípios) de ensaio/calibração ou medição inovadoras, não descritas na literatura científica.

Para efetuar a validação do método pode ser necessário e conveniente realizar alguns (ou todos) dos estudos abaixo indicados (Guia IPAC-17025:2018):

Avaliação indireta, por evidência das suas características:

- estudo da representatividade do método, ou seja, que as características determinadas correspondem ao objetivo do ensaio/calibração;

- estudo dos princípios (fundamentos) teóricos do método para evidenciar a base científica do método;
- estudos de interferências e fontes de erro para delinear a sua aplicabilidade e dominar a sua execução;
- estudos de otimização das condições operatórias e/ou robustez do método para permitir uma otimização e harmonização da sua execução;
- estudo dos parâmetros característicos do método (por exemplo campo de aplicação, exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, incerteza, etc.), para conhecer a qualidade dos seus resultados.

Avaliação direta, por comparação com referências aceites:

- comparação com métodos normalizados ou de referência;
- comparação com padrões ou materiais de referência certificados;
- comparações interlaboratoriais

As características de desempenho dos métodos validados devem ser pertinentes às necessidades dos clientes e consistentes com os requisitos especificados. O laboratório deve reter os seguintes registos de validação:

- especificação dos requisitos;
- procedimento de validação utilizado;
- determinação das características de desempenho dos métodos;
- resultados obtidos;
- uma declaração sobre a validade do método, detalhando a sua adequação ao uso pretendido.

A terminologia a usar pelos laboratórios deve ser coerente com o VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) (Guia IPAC-17025:2018).

Subsecção 7.3 – Amostragem

Interpreta-se que a designação de amostragem não se refere à preparação da amostra ou item recebido para ensaio/calibração, mas sim à sua recolha de forma representativa – pode abranger as actividades de concepção do plano de amostragem, recolha de amostras ou itens (incluindo preservação e conservação, se aplicável) e o seu transporte até ao(s) laboratório(s) que efectua(m) a(s) determinação(ões). Apenas serão auditados os requisitos associados a esta atividade se ela estiver especificamente incluída no âmbito da acreditação (Guia IPAC-17025: 2018). O laboratório deve ter um plano e um método de amostragem, que aborde os fatores a serem controlados e se baseie em métodos estatísticos apropriados, a fim de assegurar a validade dos resultados de ensaio e calibração subsequentes. Estes documentos, devem estar disponíveis no local onde a amostragem for realizada. O método de amostragem deve descrever a seleção de amostras ou locais, o plano de

amostragem, a preparação e tratamento de amostra(s) de uma substância, material ou produto para produzir o item requerido para ensaio ou calibração subsequente.

O laboratório deve reter registos dos dados da amostragem que fazem parte do ensaio ou calibração que for realizado, devendo incluir Guia IPAC-17025: 2018):

- Referência ao método de amostragem e equipamento utilizado;
- Dados para identificar e descrever a amostra;
- Identificação do pessoal que realizou a amostragem, data e hora;
- Condições ambientais ou de transporte;
- Desvios, adições ou exclusões do método de amostragem e do plano de amostragem

Subsecção 7.4 – Manuseamento dos Itens a Ensaiar ou Calibrar

O sistema de identificação de itens (o termo *itens* pode ser entendido como produtos, amostras, materiais a ensaiar ou equipamentos a calibrar, consoante aplicável) a ensaiar/calibrar pode ser feito, por exemplo, através de etiquetas, marcação, código do equipamento, referência do cliente. Considera-se implícita a existência de um sistema para registo de entrada dos itens a serem ensaiados/calibrados. Considera-se apropriado fazer subdivisão de amostras, por exemplo, quando a amostra tem de seguir para diferentes locais de ensaio/calibração simultaneamente, como p.e. química e microbiologia (Guia IPAC-17025, 2018).

O laboratório deve ter um procedimento para o transporte, recepção, manuseamento, proteção, armazenamento, retenção e descarte ou retorno dos itens de ensaio ou calibração, incluindo todas as providências necessárias para a proteção dos interesses do laboratório e do cliente (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 7.5 – Registos técnicos

Os registos das atividades laboratoriais podem ser feitos, por exemplo, em impressos próprios, cadernos de operador (ou de ensaio), registos fornecidos pelo equipamento, ou em sistemas de gestão da informação computadorizados.

Recomenda-se que, para os registos serem identificáveis com as tarefas, sejam usados impressos próprios ou efetuados de modo previamente estabelecido. Os registos devem ser inteligíveis, não apenas pelas pessoas que atualmente integram o laboratório, mas também por aquelas que o virão a integrar no futuro e poderão também ter que os interpretar (Guia IPAC-17025, 2018).

Subsecção 7.6 – Avaliação da incerteza de medição

Os ensaios para os quais é obrigatória a estimativa da incerteza de medição, também constam da lista de ensaios. O procedimento para o cálculo das incertezas deve estar identificado no MQ.

O laboratório deve possuir registos da implementação da estimativa de incertezas, nomeadamente a identificação das principais componentes a considerar, aceitando-se haver situações em que a quantificação rigorosa dessas componentes seja impossível e, portanto, sejam feitas apenas estimativas aproximadas. Neste caso, o laboratório deve evidenciar a impossibilidade de quantificação rigorosa das componentes em causa.

Na avaliação da incerteza, é aceitável considerar a contribuição de certas componentes como desprezáveis e, como tal, não serem contabilizadas no balanço final. Para tal, pode usar-se o critério de se considerar desprezável a contribuição de componentes que no seu todo não ultrapassem 1/5 do total de contribuições não-desprezadas.

Recomenda-se que os pressupostos assumidos sejam periodicamente reavaliados de forma a confirmar-se (ou não) a sua validade.

É igualmente aceite o uso de valores máximos para certas componentes, com base em estudos documentados, facilitando a determinação da incerteza em situações semelhantes.

Dado que nem sempre é possível uma estimativa rigorosa, pode fazer-se uma estimativa global ou das principais componentes, com base na experiência, dados de validação, de comparações interlaboratoriais e de controlo da qualidade (Guia IPAC-17025, 2018).

Subsecção 7.7 – Assegurar a validade dos resultados

A monitorização deve ser planeada, examinada e incluir (Soares, 2010):

- Uso regular de materiais de referência certificados e/ou controlo da qualidade interna com recurso a materiais de referência secundários;
- Participação em programa de cooperação interlaboratorial ou ensaio de aptidão;
- Ensaios e/ou calibrações em replicado, utilizando os mesmos métodos, ou métodos diferentes;
- Novo ensaio ou calibração de itens retidos;
- Correlação dos resultados de características diferentes de um mesmo item.

A monitorização da validade dos resultados deve ser mais frequente e exaustiva nas áreas em que não exista rastreabilidade metrológica às unidades do SI como, por exemplo, alguns ensaios químicos e biológicos.

A participação em comparações interlaboratoriais não dispensa a participação em ensaios de aptidão, dada a política ILAC sobre a matéria, transposta no DRC005. Por outro lado, a indisponibilidade de ensaios de aptidão não dispensa a participação noutras comparações interlaboratoriais eventualmente disponíveis. Nestes casos, quando viável, o laboratório deve participar em comparações organizadas por terceiros (e.g. para efeitos de desenvolvimento e caracterização de métodos normalizados ou de validação de métodos). Como último recurso, o

laboratório deve procurar organizar comparações com laboratórios acreditados para os mesmos âmbitos. devem ser mantidos registos das pesquisas e iniciativas associadas para as situações em que não se revele possível participar em qualquer comparação (Guia IPAC-17025, 2018)

Subsecção 7.8 – Apresentação dos Resultados

A apresentação dos resultados de cada ensaio e/ou calibração realizados pelo laboratório deve ter uma forma exata, clara, inequívoca e objetiva, de acordo com as instruções específicas de cada método de ensaio e/ou calibração.

Normalmente os resultados são apresentados em forma de relatório e devem incluir a seguinte informação (Soares, 2010):

- Título (ex: Relatório de Ensaio ou Certificado de Calibração);
- Nome e morada do laboratório;
- Local onde os ensaios e/ou calibrações foram realizados;
- Identificação inequívoca do relatório de ensaio ou certificado de calibração;
- Identificação clara do final do relatório de ensaio ou certificado de calibração;
- Nome e morada do cliente;
- Identificação do método utilizado;
- Descrição, estado e identificação inequívoca dos itens ensaiados ou calibrados;
- Data da receção dos itens para ensaio ou calibração;
- Data da realização do ensaio ou calibração;
- Referência ao plano e aos procedimentos de amostragem;
- Os resultados do ensaio ou calibração;
- Nomes, funções e assinaturas ou identificação equivalente das pessoas que autorizam o relatório de ensaio ou certificado de calibração.

Os relatórios de ensaios devem contemplar a informação descrita e sempre que seja necessário para a interpretação dos resultados de ensaios, devem incluir:

- Data da amostragem;
- Local da amostragem, incluindo quaisquer diagramas, esboços ou fotografias;
- Pormenores relativos às condições ambientais durante a amostragem que possam afectar a interpretação dos resultados do ensaio;
- Qualquer norma ou outra especificação relativa ao método ou procedimento de amostragem, e os desvios, adições ou exclusões à especificação em questão.

Sempre que um laboratório apresente um relatório de ensaio acreditado terá obrigatoriamente que usar a marca de acreditação e assinalar os ensaios fora do âmbito da acreditação, bem como os ensaios subcontratados (Soares, 2010).

Subsecção 7.9 – Reclamações

O laboratório deve considerar como reclamação todas as manifestações de insatisfação pelos serviços prestados, quer sejam orais ou escritas. Considera-se que normalmente é possível providenciar retorno ao reclamante exceto quando a reclamação seja anónima ou se constatarem erros nos elementos de contacto do reclamante. Caso seja necessário envolver pessoal externo no estabelecimento de conclusões, ou na sua revisão e aprovação, o laboratório deve definir requisitos de competência para esse pessoal (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 7.10 – Trabalho não conforme

Considera-se necessário notificar o cliente se forem constatados desvios que possam afetar a validade dos resultados. Nessas circunstâncias o trabalho deve ser repetido, se possível (Guia IPAC-17025: 2018). Em todo o caso, terá que ser identificada a causa para resolução da mesma, de forma a evitar repetições.

Subsecção 7.11 – Controlo de dados e gestão da informação

Requer validação do funcionamento do sistema de informação, incluindo suas interfaces, antes da sua implementação e após alterações. Caso utilize sistemas de informação mantidos externamente, o fornecedor deve atender os requisitos da ISO/IEC 17025 (exemplo, confidencialidade, recuperação da informação etc.). No fundo, a abordagem da gestão da informação está relacionada à gestão de dados e informações necessários para prover as atividades de laboratório, ou seja, presentes em todos os processos do laboratório.

Na tabela 3, apresentam-se as principais alterações introduzidas na ISO/IEC 17025, face à edição anterior, no que diz respeito aos Requisitos de Gestão (subsecção 8.1 a 8.9).

Subsecção 8.1 – Opções

O laboratório deve estabelecer, documentar, implementar e manter um sistema de gestão que seja capaz de apoiar e demonstrar o atendimento consistente aos requisitos desta Norma e assegurar a qualidade dos resultados do laboratório. Além de atender aos requisitos das seções 4 a 7 desta Norma, o laboratório deve implementar um sistema de gestão de acordo com a Opção A ou Opção B.

Opção A – requisitos especificados na ISO/IEC 17025 sobre gestão de documentos, que inclui controlo de registos, risco e oportunidades de melhoria, auditorias internas e análise crítica do sistema de gestão.

Opção B – o laboratório implementa um sistema de gestão de acordo com a ISO 9001, que seja capaz de assegurar e demonstrar o atendimento consistente à ISO/IEC 17025.

A opção B permite aos laboratórios que tenham implementado um sistema de gestão em conformidade com a ISO 9001 utilizá-lo como suporte para cumprir os requisitos do sistema de gestão definidos nas secções 8.2 a 8.9 da norma. No entanto, a opção B não requer que o sistema de gestão do laboratório esteja certificado de acordo com a ISO 9001 (Camargo, 2018; Guia IPAC 17025:2018)

Tabela 3 - Requisitos do Sistema de Gestão e principais alterações introduzidas, de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2018

Subsecção da Norma	Requisitos de Gestão	Principais Alterações
8.1	Opções	<ul style="list-style-type: none"> • Existência de duas opções para implementação do SG • Necessidade de identificar opção A ou B
8.2	Documentação do sistema de gestão	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminada a necessidade de um manual de gestão da qualidade • As políticas e objectivos devem incluir pelo menos competência, imparcialidade e funcionamento consistente
8.3	Controlo de documentos do sistema de gestão	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminada a necessidade de uma lista de documentos
8.4	Controlo de registos	--
8.5	Ações para abordar riscos e oportunidades	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de considerar riscos e oportunidades associados às actividades do laboratório – planeamento e desenvolvimento de ações
8.6	Melhoria	--
8.7	Ações correctivas	<ul style="list-style-type: none"> • Processo de acções correctivas carece de interface com o processo de tratamento de riscos e oportunidades
8.8	Auditorias internas	<ul style="list-style-type: none"> • Eliminada a preferência por auditores independentes
8.9	Revisão pela gestão	<ul style="list-style-type: none"> • Monitorização das mudanças da envolvente interna e externa relevantes para o laboratório • Retorno da informação do pessoal

Subsecção 8.2 – Documentação do Sistema de Gestão

Os requisitos especificados na ISO/IEC 17025:2018 encontram-se alinhados ao texto dos requisitos da ISO 9001:2015, daí a hipótese de sistema de gestão de acordo com a Opção B. Na documentação do Sistema de Gestão devem estar incluídas as políticas e objetivos do laboratório, bem como o Compromisso da gestão com a melhoria da eficácia.

Subsecção 8.3 – Controlo de documentos do sistema de gestão

Considera-se que os documentos são todos os que estabeleçam orientações relevantes para a acreditação de laboratórios e constituem uma forma comprovada de satisfação dos requisitos relevantes da NP EN ISO/IEC 17025.

Compete a cada laboratório manter sob controlo os documentos externos que lhe sejam aplicáveis. Recomenda-se que a necessidade de revisão de cada documento seja analisada com uma periodicidade máxima de 4 anos. Os documentos obsoletos podem estar identificados, por exemplo, através de carimbos, etiquetas, grafismos ou segregação em diretorias específicas. O prazo de arquivo de documentos obsoletos deve ser igual ou superior a 5 anos (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 8.4 – Controlo dos registos

Os registos evidenciam a conformidade e muitos são o suporte para elaboração de documentos. Assim, os registos devem ser controlados e mantidos. Considera-se que os registos de equipamentos (por exemplo certificados de calibração) devem ser conservados durante a vida útil do equipamento, acrescida de dois anos, de modo a ser evidenciada a respetiva conformidade durante o período de atividade. O local de arquivo pode estar localizado dentro ou fora do laboratório, mas deve estar acessível durante a realização da avaliação presencial (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 8.5 – Ações para abordar riscos e oportunidades

O laboratório deverá documentar o plano para abordar os riscos e oportunidade que precisam de ser tratados (Guia IPAC-17025: 2018). No geral, o conceito de risco inclui medidas preventivas e oportunidades de melhoria. O laboratório é responsável por decidir os riscos e oportunidades que precisam de ser tratados, podendo utilizar, entre outras, ferramentas como a análise SWOT - *Strengths* (Forças), *Weaknesses* (Fraquezas), *Opportunities* (Oportunidades) e *Threats* (Ameaças).

Subsecção 8.6 – Melhoria

O laboratório deve identificar e selecionar oportunidades para melhoria e implementar quaisquer ações necessárias. Podem ser identificadas por meio da análise crítica dos procedimentos operacionais, do uso de políticas, objetivos gerais, resultados de auditorias, ações corretivas, análise crítica pela gerência, sugestões feitas pelo pessoal, avaliação de risco, análise de dados e resultados de ensaios de proficiência. A melhoria contínua pode ser implementada com base em projetos (p.e. melhorar o desempenho de um método, efetuar atualização de *software*, diminuir o tempo de resposta aos clientes) e definindo indicadores mensuráveis e metas a atingir que permitam a monitorização sistemática da evolução do cumprimento dos objetivos do sistema de gestão. Recomenda-se que seja feito um acompanhamento programado de avaliação da eficácia da implementação dos projetos de melhoria e que os resultados da avaliação sejam divulgados como forma de motivação do pessoal envolvido (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 8.7 – Ações corretivas

Aqui estão englobadas as regras e as responsabilidades inerentes a:

- Análise das causas;
- Definição e implementação de ações corretivas decorrentes de reclamações, trabalhos não conformes, auditorias da qualidade, etc.;
- Definição dos meios para implementação das ações corretivas, responsabilidades e prazos;
- Seguimento das ações corretivas e subsequente fecho;

Os detalhes sobre a implementação das ações corretivas, bem como o modelo de impressos para não conformidades e ações corretivas têm que ser definidos. O laboratório terá que definir em que condições se justifica a realização de auditoria complementar. Uma auditoria complementar pode justificar-se, por exemplo, quando uma ação corretiva pontual não garante, por si só, a reincidência da não conformidade detetada. As causas de não conformidades poderão ter um carácter fortuito ou sistemático, serem de ordem interna ou externa ao laboratório e poderão ter qualquer uma das seguintes origens (Guia Relacre 11, 2006):

- Pessoal e formação;
- Tecnologia;
- Informática;
- Formação;
- Gestão;
- Legal;
- Científica;
- Desconhecida.

As ações corretivas devem ser apropriadas aos efeitos das não conformidades encontradas. O laboratório deve reter registos como evidências da natureza das não conformidades, causa(s) e quaisquer ações subsequentes tomadas e dos resultados de qualquer ação corretiva.

Subsecção 8.8 – Auditorias internas

Aconselha-se que o laboratório dedique particular importância a esta atividade para detetar e corrigir não conformidades assim como para melhorar continuamente o sistema de gestão. Recomenda-se que as auditorias internas sejam realizadas no mínimo com periodicidade anual, devendo de existir um planeamento ou cronograma das ações a realizar. As auditorias internas podem ser efetuadas por elementos do próprio laboratório ou externos, desde que:

- A iniciativa de desencadear e fechar as auditorias pertença ao laboratório;
- O laboratório evidencie que a equipa auditora possui competência para o âmbito a auditar e os métodos de realização das atividades laboratoriais envolvidas;
- As auditorias sejam eficazes.

Os registos de auditoria devem incluir a identificação dos requisitos auditados, pessoal envolvido, documentos e registos analisados bem como as atividades laboratoriais auditadas, incluindo os respetivos métodos – presenciados, simulado, avaliação de registos, etc (Guia IPAC-17025: 2018).

Subsecção 8.9 – Revisões pela Gestão

Recomenda-se que as revisões pela gestão tenham uma periodicidade mínima anual, e quando assim não aconteça, o laboratório deve apresentar razões válidas que o justifiquem (Guia IPAC-17025: 2018). Esta ação deve ter um planeamento, devem ser analisados os resultados e elaboradas as conclusões. As conclusões relevantes devem ser divulgadas a todo o pessoal do laboratório.

3.3. Sistemas de Gestão da Qualidade no Laboratório

A qualidade tem vindo a tornar-se num factor determinante da competitividade à medida que a concorrência aumenta, com a globalização dos mercados, a evolução técnica e tecnológica e as exigências crescentes dos clientes. A gestão da qualidade cada vez mais se afirma como componente central das estratégias de desenvolvimento organizacional e como forma de defesa perante a incerteza e a complexidade da envolvente competitiva, que as empresas têm que operar (Pires, 2012). Atualmente, o cliente é mais exigente em termos de qualidade dos produtos ou serviços exigidos, criando uma necessidade de melhoria constante pelas empresas (Río-Rama, et al., 2015).

Um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) é, um conjunto de medidas organizacionais aptas a transmitir a confiança de que um determinado nível de qualidade está a ser alcançado, de preferência com o mínimo custo. Este sistema é capaz de alcançar e otimizar objetivos, assegurando de forma sistemática a atribuição de recursos e responsabilidades, para que a organização, no que respeita à qualidade, cresça viável, efetiva e competitiva (Pires, 2012). A implementação de um SGQ permite que cada membro de uma empresa saiba o que fazer e o que se espera do seu trabalho, como fazer o seu trabalho, como e quando realizar as suas tarefas, o que permite que cumpra com as especificações técnicas que se esperam desde o início (Río-Rama, et al., 2015). A consciencialização das organizações de que a implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade traz benefícios à organização e que a satisfação dos clientes está sempre em primeiro lugar, são determinantes para o sucesso da organização (Khodabocus, 2011). Nesse contexto, um SGQ documentado é um pré-requisito para a obtenção da acreditação. De facto, muitos laboratórios que pretendem a acreditação, começam por implementar um SGQ, como a ISO 9001, cumprindo com os Requisitos de Sistema de Gestão especificados na ISO/IEC 17025:2018 (hipótese de sistema de gestão de acordo com a Opção B).

4. CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

Esta tese de mestrado foi desenvolvida no Laboratório de Controlo Qualidade Alimentar, Lda (LCQA). O laboratório de controlo e qualidade alimentar, sito em Bragança, foi construído em 1997, com o objetivo de efetuar o controlo analítico, nomeadamente de águas e produtos alimentares. Com os meios tecnológicos já instalados, com os investimentos realizados e com a contínua formação e especialização dos seus técnicos, o LCQA tem vindo a apostar no desenvolvimento e melhoramento tecnológico dos seus processos e garantia do controlo de qualidade, bem como no alargamento dos serviços disponibilizados.

Um dos objectivos no imediato do LCQA, é então evoluir para um laboratório de referência, tendo como missão o desenvolvimento de metodologias analíticas que possam complementar a oferta na área das análises microbiológicas das águas de consumo, géneros alimentícios e de esfregaços de superfície, com elevado rigor e critérios de qualidade que permitam o seu devido reconhecimento. Nesse sentido, o LCQA implementou de raiz um novo laboratório, que atende aos requisitos legais e aos requisitos específicos da ISO/IEC 17025:2018.

Para a construção do novo laboratório do LCQA (Figura 4), o *layout* das instalações foi projetado de modo a evitar o risco de contaminação cruzada, de acordo com o princípio de "marcha em frente", bem como os materiais usados, quer no chão, paredes, tetos e bancadas reduzindo o risco de contaminação.

Em termos de área, esta foi projectada no sentido de ser compatível com o volume de análises a tratar e a organização geral interna do laboratório, seguidas em baixo algumas especificações sobre o espaço em causa:

- As paredes, tectos e piso são feitos de material resistente e de fácil limpeza e desinfeção;
- O piso é antiderrapante, impermeável, e resistente à corrosão e aos agentes de limpeza e desinfeção, apresentando os cantos arredondados;
- O sistema de ventilação de ar para o interior do laboratório é introduzido através de um sistema de filtro absoluto, tipo HEPA (alta eficiência de filtração), e que permite a manutenção da temperatura do ar entre os 18 a 27 °C;
- Possui um sistema de extracção adequado para evitar a propagação de cheiros;
- O ambiente do laboratório é protegido contra os efeitos nocivos da radiação solar através da aplicação de uma película protectora colocada nos vidros;
- É sustentado por energia eléctrica, gás canalizado, iluminação adequada em cada divisão do laboratório;
- As bancadas de laboratório e mobiliário são fabricados em material liso, e impermeável, de fácil limpeza e desinfeção;
- Presença de lavatório de mãos perto da porta na sala de microbiologia, com torneira acionada com pedal;

- Existência de sistemas de segurança para a cobertura de incêndio, detector de monóxido de carbono, detector de gás, emergência eléctrica, e disposição de instalações de primeiros socorros;
- Dispõe ainda, de um lava-olhos que deverá ser utilizado, caso haja necessidade de lavagem dos olhos do operador em virtude de uma contaminação química ou biológica, e de chuveiro que deverá ser utilizado caso a contaminação do próprio operador seja extensa.



Figura 4 – Aspetto geral da entrada do LCQA



Figura 5 – Zona de Preparação de Meios de Cultura



Figura 6 - Parte da Sala de Microbiologia



Figura 7 - Zona de Incubação



Figura 8 - Zona das Confirmações e Repicagens



Figura 9 - Sala de Lavagem de material, Esterilização e Descontaminação

O laboratório LCQA foi projetado numa área total de 200 m², constituída por espaços e salas devidamente separadas de acordo com as atividades que se podem exercer, nomeadamente:

- **Sala de Receção e Registo de Amostras:** área onde as amostras são recebidas e registadas, com um código de referência interno.
- **Zona de Armazenamento das Amostras:** locais onde as amostras são armazenadas, já com o código.

Área de Microbiologia:

- **Zona de Preparação de Meios de Cultura:** área onde os meios de cultura são preparados. Esta área é dotada de placas de aquecimento, purificador de água tipo 2, exaustor, bico de Bunsen, balança analítica e potenciómetro (Figura 5).
- **Zona de Preparação das Amostras:** local onde as amostras que necessitam de preparação, são pesadas/quantificadas e diluídas, com solvente próprio, em rigorosas condições de assepsia.
- **Zona de Análises das Águas de Consumo:** área destinada às análises das águas de consumo e onde está a rampa de filtração (Figura 6). Antes de serem realizados os procedimentos, são feitas as marcações necessárias (número de amostra, diluição e meio) conforme as indicações das normas de trabalho (boletim de análise).
- **Zona de Análises de Alimentos:** área destinada às análises de alimentos, dotada de câmara de fluxo laminar com janela frontal em vidro deslizante, de funcionamento eléctrico, sistemas de controlo e de status/alarmes por microprocessador em écrans separados, e com lâmpada de esterilização UV. Possui também um Stomacher, bico de Bunsen e um vortex (Figura 6).
- **Zona de Incubação:** área onde de encontram as várias estufas a diferentes temperaturas, para incubação dos meios inoculados (Figura 7). O tempo e a temperatura de incubação dependem do microrganismo/ meio de cultura, o que se encontra estabelecido em normas e procedimentos internos.
- **Zona de Contagem e Repicagens:** depois da incubação, são analisados os resultados, nomeadamente procedendo à contagem das colónias das placas de Petri, sendo estes registados (Figura 8). Existem amostras que necessitam de ser repicadas para meios seletivos, outras necessitam de testes de confirmação.

Sala de Lavagem e preparação de Material:

- **Zona de Lavagem de Material:** área onde todo o material utilizado no laboratório de microbiologia é lavado (Figura 9).

- **Zona de Descontaminação:** área onde se encontra uma autoclave que faz a descontaminação das amostras contaminadas e do material que entra em contacto com estas.
- **Zona de Esterilização:** área onde se encontra uma autoclave que faz a esterilização de meios de cultura e todo o material limpo necessário.

O mercado cada vez mais recorre a empresas com ensaios acreditados para obter um serviço que seja realizado de forma íntegra, competente, objetiva e eficiente. O LCQA está em fase de implementação da NP EN ISO/IEC 17025, já que a acreditação de ensaios é um fator de posicionamento de mercado e uma vantagem competitiva, com o intuito de:

- ✓ ser capaz de responder a um mercado mais exigente;
- ✓ aumentar a sua credibilidade pela garantia da confidencialidade e da capacidade de trabalhar,
- ✓ dar garantias ao cliente de que os ensaios são realizados com pessoal competente, que dispõe de equipamento adequado, e que os métodos de ensaios são credíveis;
- ✓ aumentar a confiança do cliente aquando da aquisição de um ensaio acreditado.

De facto, o LCQA já apresenta um Sistema de Gestão da Qualidade de acordo com as normas de referência ISO 9001:2015 e ISO/IEC 17025:2018.

Em cumprimento com a Política de Qualidade adotada, o LCQA, tem participado anualmente em ensaios interlaboratoriais organizados em Portugal pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e a nível europeu pelo *Health Protection Agency*, para controlo da qualidade dos ensaios de microbiologia que afetam a águas e alimentos.

Além disso, o LCQA foi admitido como associado, desde 2007, na RELACRE (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal), com o nº ADC. 322, o que permite uma atualização constante dos requisitos exigidos, bem como acesso a ações de formação específicas de forma a atualizar os conhecimentos de competência técnica dos funcionários.

Assim, com este trabalho pretende-se contribuir para a documentação necessária no âmbito da acreditação, nomeadamente implementando os requisitos técnico-científicos necessários ao processo da acreditação deste método no Laboratório LCQA.

5. CASO DE ESTUDO

5.1. *Staphylococcus* coagulase-positivo: *Staphylococcus aureus*

Existem potenciais fontes de contaminação para os alimentos, como p.ex. os utensílios mal higienizados ou o próprio manipulador dos alimentos (através das mãos, boca, pele, etc.) devido às práticas de higiene pessoal incorretas. Segundo a WHO (2017), “a contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase do processo desde a produção até ao consumo – desde o prado ao prato – e pode resultar de contaminação ambiental, incluindo poluição da água, solo ou ar”. Assim, a preparação inadequada dos alimentos pode dar origem a doenças de origem alimentar, nomeadamente, infeções ou intoxicações alimentares, que põe em risco a saúde do consumidor, tornando-se um problema grave de Saúde Pública a nível global.

Existem vários microrganismos responsáveis por causar doenças de origem alimentar, entre os quais, bactérias do género *Staphylococcus* - *Staphylococcal food poisoning* – que por definição, consiste numa intoxicação causada pelo consumo de alimentos com quantidades significativas de enterotoxinas que despoletam a doença (Fusco et al., 2018). As enterotoxinas são produzidas pelo microrganismo, quando este está presente no alimento e em condições propícias ao crescimento bacteriano. Os alimentos mais frequentemente associados a esta patologia são as carnes, ovos, leite e produtos de pastelaria (Stewart, 2017).

As bactérias do género *Staphylococcus* pertencem à família Staphylococcaceae sendo conhecidas, até ao momento, 49 espécies (Gherardi et al, 2018; Hetem et al., 2017). São cocos gram-positivos, não móveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, com um diâmetro de cerca de 0,5 a 1,5 µm e podem aparecer na forma de células individualizadas ou agrupar-se em cachos. A presença ou ausência de catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, permite distinguir este género de outros, como *Streptococcus* e *Enterococcus*, sendo o género *Staphylococcus*, catalase positivo. A prova da coagulase permite dividir o género em dois grupos: coagulase-negativo e coagulase-positivo, sendo a maioria coagulase-negativo (Morente, 2016; Toltzis, 2018).

Staphylococci está amplamente distribuído na natureza, estando presente na flora comensal da pele e mucosas de animais e humanos, no ambiente e em alimentos. Os alimentos que são consideravelmente manipulados na sua confeção e conservados a temperaturas não adequadas, são suscetíveis a serem contaminados com este género bacteriano, levando a doenças de origem alimentar. Em Portugal, a intoxicação por este agente patogénico é das mais frequentes, devido à falta de higiene associada aos manipuladores dos alimentos (Novais, 2010). As intoxicações alimentares estão associadas a toxinas (produzidas por esta bactéria) presentes nos alimentos. As intoxicações alimentares causadas por *S. aureus*, ao contrário de outras bactérias, são devido à contaminação do alimento pelo Homem, portador da bactéria, muitas vezes, assintomático (Haaber

et al., 2017; Miao et al., 2017). Esta bactéria é suscetível a altas temperaturas, a desinfetantes e soluções antissépticas, no entanto, conseguem sobreviver em superfícies secas durante longo período de tempo. Podem ser transmitidas através de contato físico direto ou contato com objetos contaminados e manifestam-se, principalmente, em pessoas imunocomprometidas. As toxinas extracelulares produzidas são termorresistentes, pelo que a confecção dos alimentos utilizando o calor, não torna os alimentos seguros para consumo (Haaber et al., 2017; Miao et al., 2017).

Pela pertinência deste tipo de risco microbiológico nos alimentos, optou-se assim por selecionar o método da Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003, aplicável a Géneros alimentícios e alimentos para animais.

5.2. Princípio do Método de Ensaio

5.2.1 Preparação da amostra

A preparação da amostra para análise microbiológica constitui o processo pelo qual a amostra é tornada apta para quantificação dos microrganismos nela existentes (por unidade de volume ou de massa). A preparação da amostra para análise deve efetuar-se com todos os cuidados de assepsia, de forma a evitar qualquer contaminação e a permitir uma distribuição homogénea dos microrganismos nela presentes. A técnica de preparação da amostra depende do respetivo estado físico e no caso em concreto foram considerados alimentos sólidos, já que são estes que maioritariamente chegam ao LCQA para análise. Assim, para efeitos do presente trabalho a preparação da amostra é efetuada segundo a NP 2079:1989. Em síntese, pesam-se 25 g de amostra e adicionam-se 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), de acordo com a norma ISO 6887-1:2017, e procede-se á sua homogeneização no Stomacher. A partir da solução mãe realizam-se diluições. Para a análise do parâmetro requerido será usada a suspensão mãe e as diluições.

5.2.2 Quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003

A norma ISO 6888-2:1999 é utilizada para a enumeração de estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus*) através da utilização do meio BPA (Baird Parker Agar) com RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) e com adição da gema de ovo que contém compostos na sua constituição que inibem a flora acompanhante, permitindo o isolamento de *Staphylococcus aureus* em placa. No caso de serem detetadas colónias características deve proceder-se à sua confirmação através do teste da catalase.

5.2.3. Procedimento do ensaio

O procedimento implementado no LCQA, referente à análise de *Staphylococcus aureus*, está de acordo com a norma ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003 e obedece ao esquema apresentado na figura 4 e Anexo A.1.

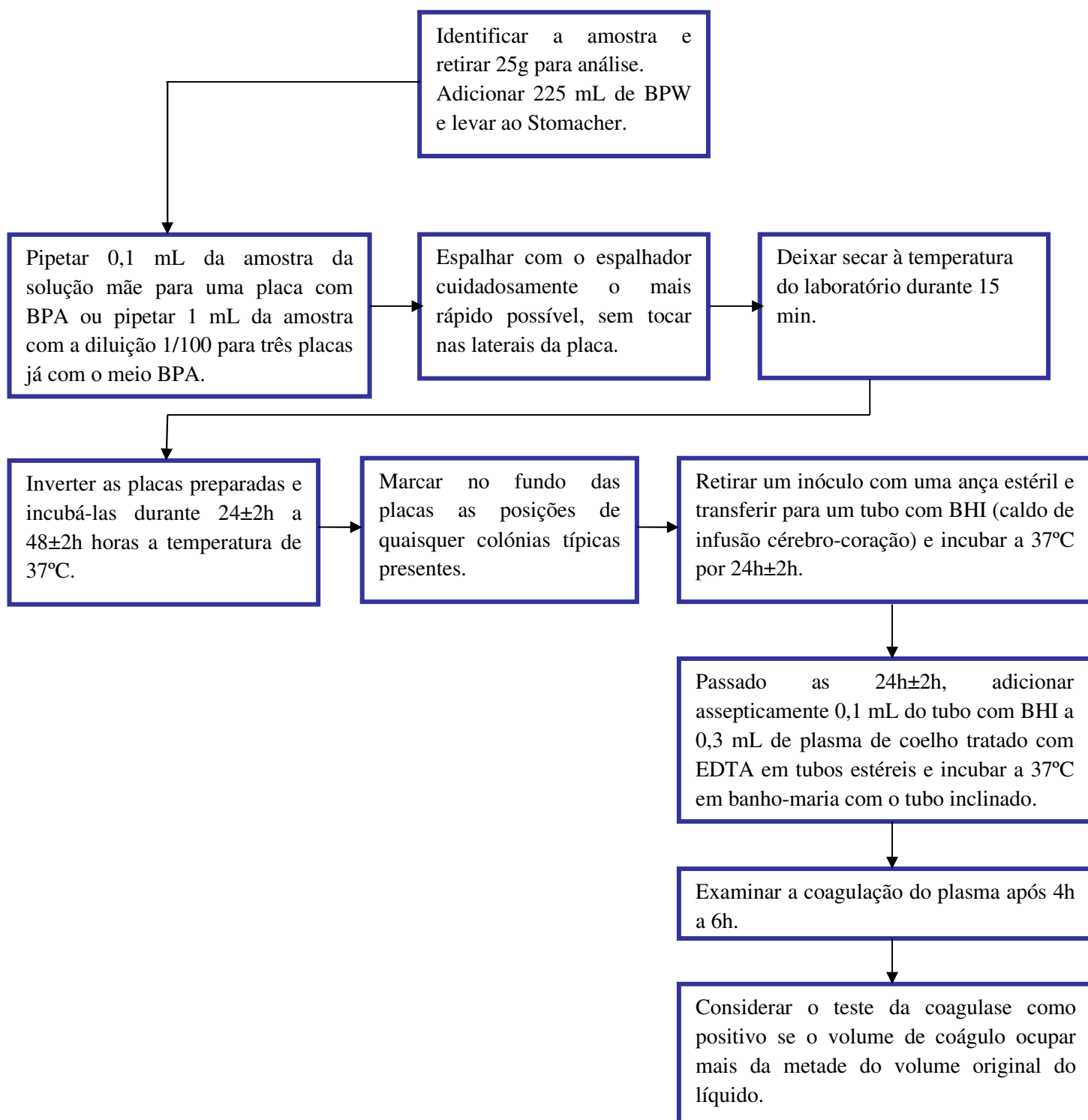


Figura 10 - Esquema representativo da metodologia de ensaio de pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003

De forma a cumprir com os requisitos de rastreabilidade, a amostra é identificada de modo a evitar trocas, devendo todo o material de análise dum amostra ser marcado com o número de registo da amostra, a temperatura de incubação, o meio de cultura utilizado e a data de realização. Quando relevante deve ainda incluir a identificação do técnico.

Todos os resultados devem ser devidamente registados, incluindo sempre as leituras intermédias (provas de confirmação, repicagens, características de colónias, entre outras) para a apresentação do resultado final.

As folhas de registo devem ser rubricadas pelo responsável pela realização da análise e responsável pelas leituras.

5.3. Validação do método analítico

A acreditação não é mais do que a validação de métodos analíticos, comprovada através de evidências objetivas de que os requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos. Pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceites como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (Silva e Alves, 2006). Para um controlo efetivo dos resultados e para a garantia da interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação. Segundo a norma ISO/IEC 17025 a validação de um método analítico consiste na *comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido* (IPAC, 2012). O objetivo fundamental da validação é confirmar que as características do método satisfazem as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controlo a aplicar no trabalho de rotina (Coelho, 2010). Assim, é essencial que o método de validação se encontre descrito num procedimento laboratorial e que a determinação dos parâmetros de validação seja efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, devidamente calibrados. Para além disso, os analistas devem ser adequadamente treinados e qualificados (ISO/IEC 17025:2005; EMA, 2011).

Em análises quantitativas parâmetros, tais como, gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exatidão são importantes. No entanto, em análises qualitativas, os aspetos mais relevantes são o limite de deteção, a seletividade/especificidade e a robustez (Eurachem, 2014).

Geralmente os ensaios microbiológicos carecem de calculo rigoroso e estatisticamente válido da Incerteza da Medição (IM). Assim, a IM deve ser calculada por abordagem global com base no desempenho, sendo que os principais fatores de incerteza são:

- Equipamentos /Manutenção e calibração do equipamento
- Meios /Preparação e armazenagem correta de meios, controlo
- Reagentes / Armazenagem correta e controlo
- Operador /Treino e qualificação do pessoal
- Tempo

A necessidade de evidenciar o controlo de qualidade para cada um destes fatores, implica genericamente apresentar um plano de manutenção e calibração do equipamento, procedimento para a preparação e armazenagem correta de meios e seu controlo, procedimento de armazenagem e controlo dos diferentes reagentes, o treino e qualificação adequada do pessoal e o desempenho do operador na execução do ensaio. Nesse contexto será dado maior ênfase a alguns destes documentos.

5.3.1. Metodologia Para Validação do Método de Ensaio

O laboratório deve estabelecer, documentar, implementar e manter um sistema de gestão que evidencie que os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025:2018 são atendidos. Nesse sentido foi elaborado um procedimento que visa estabelecer diretrizes para a elaboração e controlo de documentos e registos do sistema de gestão da qualidade do LCQA. Este procedimento aplica-se a todos os documentos e registos relevantes para o Sistema de Gestão da Qualidade do LCQA. Da estrutura dos documentos salientam-se os Procedimentos da Qualidade (PQ) – abordam aspetos relativos ao cumprimento de requisitos das normas de qualidade (ex: Elaboração e controlo de documentos); Procedimentos Operacionais Padrão (POP) e Instruções de Trabalho (IT) – contemplam as atividades técnicas do LCQA com o objetivo de padronizar a execução de determinadas tarefas. Para a validação do método da Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, de acordo com a ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003, aplicável a Géneros alimentícios e alimentos para animais, foram elaborados e implementados vários desses documentos que demonstram a sua implementação, em cumprimento com as características de desempenho do mesmo e que suportam a validação do método ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003, em cumprimento com os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025.

Para obter a acreditação os laboratórios devem cumprir com os requisitos presentes na ISO 17025, no entanto existem orientações específicas para os ensaios microbiológicos. Considera-se que a análise microbiológica inclui ensaios de esterilidade, deteção, isolamento, contagem e identificação de microrganismos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) e seus metabolitos em diferentes materiais e produtos, ou qualquer tipo de ensaio que utilize os microrganismos, como uma parte de um sistema de deteção assim como a utilização de microrganismos para estudos ecológicos (Guia Relacre n.º 6, 2007).

Assim, para um laboratório acreditar um método microbiológico, de acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025, tem que levar a cabo várias etapas e cumprir com vários requisitos, que, muitas da vezes, são comuns a diferentes métodos microbiológicos, nomeadamente:

✓ **T1 - O planeamento e a execução da implementação** que inclui entre outros a elaboração duma instrução de trabalho para execução do método, de acordo com o método selecionado, conforme exemplo no Anexo A.1. Aqui são definidas as responsabilidades de implementação do procedimento, as etapas para a enumeração e confirmação dos microrganismos, bem como os registos que acompanham este procedimento. Conforme referido, o procedimento implementado está de acordo com a norma, sem qualquer tipo de alteração tanto para a deteção como para a confirmação de *Staphylococcus aureus*.

Da solução mãe e das diferentes diluições decimais, retira-se 0,1 mL de inóculo que se semeia por espalhamento, em meio de cultura BPA com RPF e com gema de ovo já adicionado, efetuando-se a contagem de colónias após incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 21 ± 3 horas. De acordo com a norma *os limites de deteção podem ser aumentados em 10 vezes, inoculando 1,0 mL da suspensão inicial*. Os ensaios são efetuados em duplicado para placas grandes ($\varnothing 140$ mm) ou em triplicado para placas pequenas ($\varnothing 90$ mm), neste caso totalizando seis placas. A contagem efetua-se nas placas com menos de 100 colónias características (coloração negra com halo opaco). Os resultados serão expressos em número de unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g).

Para a Confirmação de *Staphylococcus aureus* e de acordo com a norma:

- A partir da superfície de cada colónia selecionada (as colónias típicas são pretas ou cinza, brilhantes e convexas e cercadas por uma zona clara (1 mm a 1,5 mm de diâmetro após incubação por 24h e 1,5 mm a 2,5 mm de diâmetro após incubação por 48h), retirar um inóculo com uma ança estéril e transferir para um tubo ou frasco de BHI e incubar a 35°C ou 37°C por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.
- Adicionar assepticamente, 0,1 mL de cada cultura (presente no frasco com BHI) a 0,3 mL de plasma de coelho em tubos ou frascos de hemólise estéreis e incubar a 35°C ou 37°C .
- Inclinando o tubo, examinar a coagulação do plasma após 4h a 6h de incubação e, se o teste for negativo, reexaminar em 24h de incubação ou examinar nos tempos de incubação especificados pelo fabricante.
- Considerar o teste da coagulase como positivo se o volume de coágulo ocupar mais da metade do volume original do líquido.

- Como controlo negativo, para cada lote de plasma, adicionar 0,1 mL de BHI estéril à quantidade recomendada de plasma de coelho e incubar sem inoculação. Para que o teste seja válido, o plasma de controlo não mostrará sinais de coagulação.

Tendo em conta a natureza dos ensaios na área da microbiologia, se o resultado da contagem for negativo, deve ser referido como *não detetado para uma determinada unidade* ou *inferior ao limite de deteção para uma determinada unidade*. O resultado não deve ser dado como *zero para uma determinada unidade* a menos que seja uma exigência regulamentada. Os resultados de ensaios qualitativos devem ser referidos como *detetado / não detetado numa determinada quantidade ou volume*. Também podem ser expressos como *menor que um número específico de microrganismos para uma determinada unidade* quando o número específico de microrganismo excede o limite de deteção do método e isso for acordado com o cliente;

- ✓ **T2 - Controlo Ambiental** que inclui entre outros o controlo dos níveis de contaminação do ar e superfícies. Além da limpeza e higienização também é necessário efetuar um plano de controlo do ambiente que identifique quais os locais críticos que justifiquem este controlo, qual o método a ser aplicado, a frequência, a pessoa responsável e o devido registo.

Para efetuar o controlo da qualidade microbiológica do ar utiliza-se por exemplo método de sedimentação, que se baseia na contagem de microrganismos que se acumulam na superfície de um meio de cultura de agar (numa caixa de Petri aberta) durante um determinado período de tempo (geralmente 15 minutos). É uma forma passiva de amostragem que recolhe principalmente partículas pesadas. A placa não deve ser colocada sob luz direta nem numa superfície quente. Após o tempo de amostragem terminar, deve-se fechar a caixa e incubar.

O controlo da qualidade microbiológica das superfícies pode ser feito através de três métodos: Placa de contacto – a superfície do meio de agar é posta em contacto direto com a superfície a ser examinada; Zaragatoas – utilizadas para áreas de mais difícil acesso; Esponjas – utilizadas para grandes superfícies. No Anexo A.2 é possível ver o procedimento elaborado para o controlo bacteriológico do ar e do ambiente, bem como uma planificação deste tipo de controlo.

- ✓ **T3 - Higiene** que inclui entre outros um programa documentado de limpeza para as instalações, equipamento e superfícies laboratoriais. Devem ser estabelecidos horários regulares e sistemáticos para manutenção, limpeza e desinfeção, incluindo monitorização. Devem ser definidas ações corretivas em caso de desvios. Como exemplo apresenta-se no Anexo A.3 um procedimento para a utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.

A higiene do ambiente do laboratório e das superfícies das bancadas é um elemento muito importante das boas práticas de laboratório. Este aspeto inclui também a eliminação de resíduos. Segundo a OMS (2004), considera-se resíduo, tudo aquilo que se deve deitar fora. Nos laboratórios de microbiologia, o princípio dominante é que todo o material potencialmente infeccioso deve ser descontaminado, por esterilização em autoclave, por processos químicos ou por incineração. A gestão de resíduos produzidos no laboratório LCQA é feita de modo a minimizar a libertação de organismos viáveis. Esta gestão envolve a classificação, acondicionamento e tratamento específico dos resíduos. Este processo, tem como objetivo a manutenção das condições de higiene e segurança dos operadores, equipamentos e instalações, a proteção ambiental e a preservação da imagem do LCQA;

✓ **T4 - Manutenção, Calibração e Verificação do Equipamento** que inclui entre outros um programa preventivo e a possibilidade de contaminação cruzada e plano para calibração e verificação do equipamento que possa ter uma influência direta nos resultados de ensaio. Para a execução dos ensaios, os equipamentos utilizados têm de funcionar corretamente e, quando aplicável, têm de estar devidamente calibrados ou validados nos parâmetros pretendidos para o seu correto desempenho. Como exemplo apresenta-se no Anexo A.4 o Procedimento Operacional Padrão para o potenciómetro. O laboratório deve executar e documentar um programa para manutenção, calibração e verificação do funcionamento do equipamento como parte integrante do sistema de gestão. A manutenção do equipamento essencial deverá ser periódica e os intervalos devem ser determinados por fatores como, por exemplo, a taxa de utilização e os respetivos registos detalhados devem ser guardados. Na tabela 4, são dados alguns exemplos de requisitos de manutenção de diferentes equipamentos e respetivos intervalos.

A frequência de calibração e verificação deve ser determinado por cada laboratório, dependendo do tipo de equipamento e do nível de atividade do laboratório (ISO 7218:2007). Os intervalos entre as calibrações e verificações devem ser inferiores ao tempo que o equipamento funciona entre limites aceitáveis. Exemplos de intervalos de calibração e verificação de funcionamento para vários instrumentos de laboratório encontram-se na tabela 5.

Tabela 4 - Exemplos de requisitos e periodicidade para a manutenção do equipamento (Relacre, 2007).

TIPO DE APARELHO	REQUISITOS	FREQUÊNCIA SUGERIDA
(a) Incubadores, (b) frigoríficos, (c) congeladores, estufas	Limpar e desinfetar as superfícies internas	(a) Mensalmente (b) Quando necessário (p.e.de 3/ 3 meses) (c) Quando necessário (p.e. anualmente)
Banho-Maria	Esvaziar, limpar, desinfetar e reencher	Mensalmente ou cada seis meses se usado biocida
Autoclave	a) Verificações visuais de borracha (vedação), limpeza/câmara de drenagem b) Revisão completa c) Verificação da segurança da câmara de pressão	a) Regularmente, como recomendado pelo fabricante b) Anualmente ou como recomendado pelo fabricante c) Anualmente
Cabines de segurança Câmara de fluxo laminar	Revisão completa e verificação mecânica Revisão e verificação mecânica	Anualmente ou como recomendado pelo fabricante Anualmente ou conforme o recomendado pelo fabricante
Balanças / Diluidores gravimétricos	a) Limpeza b) Revisão	a) Cada utilização b) Anualmente
Destilador	Lavar e descalcificar	De acordo com as necessidades (p.e. de 3 / 3 meses)
Desionizador. unidade de osmose reversa	Substituir cartuxos / membranas	Conforme recomendado pelo fabricante
Jarras de anaerobiose	Limpeza / desinfecção	Cada utilização
Distribuidores de meio, Equipamento volumétrico, pipetas e equipamento geral	Descontaminação, limpeza e esterilização conforme apropriado	Cada utilização
Plaqueadores em espiral	a) Revisão b) Descontaminação, limpeza e esterilização	a) Anualmente b) Cada utilização
Laboratório	a) Limpar e desinfetar as superfícies de trabalho b) Limpar o chão, desinfetar esgotos e lavatórios c) Outras superfícies	a) Diariamente e durante utilização b) Semanalmente c) De 3 em 3 meses

Quando a temperatura tem uma influência direta nos resultados das análises ou é crítica para o funcionamento correto do equipamento, os aparelhos de medição de temperatura têm que ser de qualidade apropriada para atingirem a exatidão necessária (ex. termómetro de vidro, termopares e termómetros de resistência de platina utilizados em incubadoras e autoclaves). Os aparelhos de medição de temperatura devem ser calibrados e rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais. Sempre que a exatidão da medição de temperatura não tenha um efeito direto no resultado dos ensaios, podem ser usados aparelhos de trabalho com especificações aceites por entidades nacionais ou internacionais reconhecidas (ISO 1770 para termómetros de vidro). Estes aparelhos podem ser

usados, por exemplo, para monitorizar frigoríficos e congeladores e também estufas e banhos de água onde a tolerância da temperatura o permita. Deve realizar-se a verificação de funcionamento destes aparelhos, se necessário (Relacre, 2007).

Tabela 5 – Exemplos de calibração e verificação de calibração de equipamentos (Relacre, 2007).

TIPO DE APARELHO	REQUISITO	FREQUÊNCIA SUGERIDA
Termómetros de referência (termómetro de vidro) Termopares de referência	Recalibração completamente rastreável. Ponto único (por exemplo ponto de fusão do gelo) Recalibração completamente rastreável Verificação contra termómetro de referência	De cinco em cinco anos Anualmente De três em três anos Anualmente
Termómetros de trabalho e Termopares de trabalho	Verificação contra termómetro de referência no ponto de fusão e/ou gama de temperatura de trabalho	Anualmente
Balanças	Calibração totalmente Rastreável	Anualmente
Pesos de calibração	Calibração totalmente Rastreável	De cinco em cinco anos
Peso(s) de verificação	Verificação contra pesos calibrados ou balança recentemente calibrada	Anualmente
Cronómetros	Verificação contra sinal horário nacional	Anualmente
Material de vidro volumétrico	Calibração gravimétrica para a tolerância requerida	Anualmente
Microscópios	Calibração rastreável da objectiva micrométrica (onde apropriado)	Inicialmente

Os equipamentos devem encontrar-se em perfeitas condições, pois mesmo o pessoal mais qualificado não poderá produzir resultados fiáveis se os equipamentos disponíveis não forem adequados ou se não cumprirem os parâmetros de desempenho afetos ao ensaio (Lightfoot, 2003; Guia Relacre n.º 6, 2007). Todos os equipamentos/dispositivos de medição e ensaio devem ser avaliados quanto ao seu desempenho e devem ser mantidos os respetivos registos de calibração, manutenção e reparações (ISO 7218:2007).

Na tabela 6 são dados exemplos de validação e sua frequência, para diferentes tipos de equipamentos.

Tabela 6 – Exemplos de validação do equipamento e verificação do funcionamento (Relacre, 2007).

TIPO DE APARELHO	REQUISITOS	FREQUÊNCIA SUGERIDA
Equipamento de temperatura controlada (incubadoras, banhos, frigoríficos, congeladores)	a) Estabelecer a estabilidade/uniformidade da temperatura b) Monitorizar temperatura	a) Inicialmente, de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Diariamente/cada utilização
Estufa de esterilização	a) Estabelecer estabilidade/uniformidade da temperatura b) Monitorizar temperatura	a) Inicialmente de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Cada utilização
Autoclave	a) Estabelecer características para cargas típicas/ciclos típicos b) Monitorizar temperatura/tempo	a) Inicialmente de dois em dois anos e depois de reparação/modificação b) Cada utilização
Câmara de fluxo laminar	a) Estabelecer tipo de funcionamento b) Verificar com placas de esterilidade	a) Inicialmente e depois de reparação/modificação b) Semanalmente
Medidor de pH	Verificação da calibração usando pelo menos dois tampões	Diariamente/cada utilização
Balanças	Verificação do zero e leitura com um peso	Diariamente/cada utilização
Destilador, desionizador e unidades de osmose reversa	a) Verificação da condutividade b) Verificação da contaminação microbiológica	a) Semanalmente b) Mensalmente
Diluidores gravimétricos	a) Verificação do peso do volume distribuído b) Verificação da razão de diluição	a) Diariamente b) Diariamente
Distribuidores de meio	Verificação do volume distribuído	Cada ajustamento ou Alteração
Pipetadores/pipetas	Verificar a exactidão e a precisão do volume distribuído	Regularmente (tendo em conta a natureza e a frequência da utilização)
Plaquadores em espiral	a) Estabelecer o funcionamento contra métodos convencionais b) Verificar a condição da ponta e os pontos de início e fim c) Verificar o volume dispensado	a) Inicialmente e anualmente b) Diariamente/cada utilização c) Mensalmente
Contadores de colónias	Comparar com contagem feita manualmente	Anualmente
Jarras de anaerobiose	Verificar com indicador de anaerobiose	Cada utilização

Deve ter-se em atenção também a possibilidade de contaminação cruzada, originada a partir do equipamento, como por exemplo para o material de vidro reutilizável que deve estar devidamente limpo e esterilizado quando apropriado. Idealmente os laboratórios devem possuir mais do que uma autoclave separada para a descontaminação. Contudo, poderá haver uma só autoclave, se forem

tomadas as precauções adequadas para separar os ciclos de descontaminação e esterilização e um programa de limpeza documentado;

✓ **T5 - Reagentes e Meios de Cultura** que inclui entre outros a evidência da qualidade dos reagentes usados e a conformidade dos meios utilizando organismos de controlo positivo e negativo de coleções de culturas. Os meios de cultura e os reagentes são utilizados para estimular o cultivo de microrganismos a serem analisados, geralmente utiliza-se o meio de cultura em pó, ou podem ser adquiridos prontos para uso, vindos de fabricantes de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*, sendo a sua função tornar favorável o crescimento da bactéria. A produção de meios de cultura envolve várias etapas, tais como, escolha das matérias-primas, qualidade da água reagente, boas condições dos equipamentos, qualificação dos técnicos, registos das etapas do preparo, além do controlo de qualidade do produto acabado, que é de extrema importância. Mesmo sendo cumpridos todos os procedimentos da produção dentro das especificações, sem o controlo de qualidade do produto final, não há como assegurar que efetivamente o meio de cultura esteja adequado ao uso. Desta forma, cada lote de meio preparado deve ser submetido a um programa mínimo de testes que assegure sua aceitabilidade e demonstre desempenho bacteriano típico (OXOID., 2000). À chegada cada lote de meio ou produto químico desidratado ou pronto a utilizar deve ser inspecionado e registado. A inspeção consiste em procurar qualquer anormalidade, fuga, obstrução, etc. O registo consiste em documentar o fabricante, nome do produto, data do recebimento, quantidade, número do lote e data do vencimento. As datas do recebimento, da abertura e do vencimento devem ser registadas no frasco (Lightfoot N. F., 2003). É fundamental cruzar a conformidade da composição do meio de cultura e reagentes, com o descrito nos protocolos antes de fazer as encomendas. Em caso de desvios significativos na composição do produto, escolher produtos de outro fornecedor (Queirós, 2011).

O controlo de qualidade específico do produto preparado envolve avaliação do aspecto, de pH, de esterilidade e de desempenho. Porém, o processo deve estar garantido desde a qualidade da matéria-prima até à rastreabilidade de causas de não conformidades nos procedimentos de produção, bem como na própria metodologia do controlo de qualidade, estabelecendo ações corretivas e preventivas, conforme exemplificado na Instrução de trabalho-Controlo e preparação de meios de cultura no Anexo A.5.

Para o controlo de crescimento, sempre que possível usar estirpes ATCC (*American Type of Culture Collection*), estirpes de referências de origem e padrão definido de provas para a sua caracterização. Se não for possível o uso de estirpes ATCC, usar estirpes 100% positivas para os controlos de qualidade de crescimento realizados. O controlo da seletividade dos meios usados para a deteção de *Staphylococcus aureus*. foi realizado com *Escherichia coli*, como controlo negativo e *Staphylococcus aureus* como controlo positivo (Tabela 7). O controlo de esterilidade dos meios de

cultura utilizados na metodologia referida foi realizado, incubando placas contendo só o meio de cultura, seguido da verificação das mesmas.

O controlo de esterilidade da autoclave pode ser verificado através do uso de indicadores químicos ou biológicos para esterilização/descontaminação e pela observação direta e registo da temperatura máxima atingida e do tempo a essa temperatura. A fita indicadora de esterilização para autoclave só é usada para mostrar que uma carga foi processada, mas não como indicador para demonstrar que um ciclo aceitável de esterilização terminou.

Tabela 7 - Controlo de qualidade positivo e negativo para os meios de cultura.

Controlo de Qualidade	Positivo	Negativo
Estirpe de Referência	<i>Staphylococcus aureus coag (+)</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001
Meio Seletivo	<i>Staphylococcus aureus coag (+)</i> , colónias pretas ou cinza, brilhantes e convexas, cercadas por zona clara	<i>Escherichia coli</i> , inibição completa
Interpretação dos Resultados	Crescimento com colónias pretas ou cinza, brilhantes e convexas, cercadas por uma zona clara	Não há crescimento nem colónias características
Teste da coagulase	<i>Staphylococcus aureus coag (+)</i> ATCC (desenvolvimento de coágulo a ocupar mais da metade do volume original do líquido)	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001 (desenvolvimento de coágulo a ocupar menos da metade do volume original do líquido)

- ✓ **T6 - Materiais e Culturas de Referência** que inclui entre outros o uso de materiais de referência certificados para calibrar equipamento e permitir a comparação de métodos, o uso de culturas de referência para avaliar o desempenho dos meios e para avaliação contínua do desempenho. Materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC) fornecem a rastreabilidade necessária às medições e são usados, por exemplo, para:

- Demonstrar a exatidão dos resultados;
- Calibrar equipamento
- Monitorizar o desempenho do laboratório
- Validar métodos
- Permitir a comparação de métodos.

As culturas de referência são necessárias para estabelecer o desempenho dos meios (incluindo “Kits”), para validação de métodos e para avaliação contínua do desempenho. A rastreabilidade é necessária, por exemplo, quando se pretende estabelecer o desempenho do meio, dos “kits” e validação de métodos. Como exemplo apresenta-se no Anexo A.6 a instrução de trabalho

adotada para a reconstituição de culturas de referência. No caso em concreto, da quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e conforme referido, as estirpes de referência usadas para controlo positivo e negativo, são *Staphylococcus aureus* coag (+) ATCC 6538 e *Escherichia coli* NCTC 9001, respetivamente;

- ✓ **T7 - Pessoal** que inclui entre outros a demonstração de experiência de trabalho prático relevante, o levantamento das necessidades de formação e avaliação do desempenho do pessoal. A realização das análises microbiológicas deve ser efetuada, ou supervisionada, por pessoal experiente. Para a produção de resultados com qualidade, é importante, que todo o pessoal envolvido tenha conhecimento das suas funções e da importância das suas tarefas na obtenção desses mesmos resultados. O laboratório deve assegurar que todo o pessoal recebe formação e treino adequado ao desempenho competente dos ensaios e à utilização correta dos equipamentos (Lightfoot, 2003; Guia Relacre n.º 6, 2007). A avaliação da eficácia da formação também terá que ser evidenciada conforme exemplo no Anexo A.7.

A competência do pessoal técnico deve ser avaliada regularmente, por exemplo, através da participação em ensaios de intercomparação externa e/ou interna, ou da utilização de materiais de referência (ISO 7218:2007). A proteção do pessoal é também muito importante. Deve-se evitar a contaminação das amostras pelo analista e também para proteção da sua saúde durante a manipulação de materiais potencialmente contaminados (ISO 7218:2007).

- ✓ **T8 Ensaios interlaboratoriais** – consiste na avaliação externa da qualidade (testes de proficiência). Por definição os ensaios interlaboratoriais requerem a participação de pelo menos dois laboratórios, contudo para que os resultados tenham significado estatístico e que sejam conclusivos deve ter pelo menos cinco laboratórios participantes (Guia Relacre 7, 1996). Os laboratórios devem participar regularmente em ensaios interlaboratoriais que sejam relevantes para o âmbito da acreditação, devendo ser dada preferência a esquemas de ensaios interlaboratoriais que usem matrizes apropriadas. Em casos específicos a participação deve ser obrigatória. Os laboratórios devem utilizar a avaliação de qualidade externa, não apenas para avaliar o desvio do laboratório, mas também para verificar a validade de todo o sistema de qualidade (Relacre, 2007). O ensaio interlaboratorial estuda o desempenho do analista e do laboratório comparando resultados com a finalidade de avaliar os técnicos participantes. Quando os laboratórios participantes utilizam o mesmo método e protocolo é possível identificar características de execução do método, como erros sistemáticos e de precisão (Guia Relacre 7, 1996).

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

Como já referido, o LCQA participa anualmente em ensaios interlaboratoriais quer nacionais, organizados pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, quer europeus, organizados pelo *Health Protection Agency*, obtendo sempre resultados 100% concordantes. Estes resultados são preponderantes na validação da atividade desenvolvida pelo LCQA, e em particular, com os ensaios interlaboratoriais de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, na validação deste método (Tabela 8 e 9).

Tabela 8 - Resultados obtidos dos ensaios interlaboratoriais realizados no LCQA, para os anos 2011 a 2014

Ano	Ensaio	Resultado esperado	Resultado do LCQA	HPA score para Avaliação do Desempenho	z-score
2011	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<10 ufc. g ⁻¹	<100	9 out of 9 (100.0%)	0
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1,7x10 ² – 1,7x10 ³ ufc. g ⁻¹	1100	9 out of 9 (100.0%)	0,86
2012	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<10 ufc. g ⁻¹	<100	12 out of 12 (100.0%)	0
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1,2x10 ³ – 1,2x10 ⁴ ufc. g ⁻¹	4300	12 out of 12 (100.0%)	0,15
2013	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<10 ufc. g ⁻¹	<100	6 out of 6 (100.0%)	0
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2,2x10 ² – 2,2x10 ³ ufc. g ⁻¹	690	6 out of 6 (100.0%)	0
2014	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<10 ufc. g ⁻¹	<10	8 out of 8 (100.0%)	0
	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1,7x10 ² – 1,7x10 ³ ufc. g ⁻¹	540	12 out of 12 (100.0%)	-0,02

A avaliação do desempenho do laboratório participante é avaliada, geralmente, através da fórmula do “Z-score”: $Z = (x_i - X_{pt}) / \sigma_{pt}$

Em que,

x_i = resultado do laboratório participante (valor expresso em log₁₀)

X_{pt} = valor alvo (mediana de consenso dos resultados dos participantes – valor expresso em log₁₀)

σ_{pt} = desvio padrão estabelecido para o ensaio (calculado pelo FEPTU (Food and Environmental Proficiency Testing Unit))

O valor σ_{pt} expressa a diferença aceitável entre o resultado individual do laboratório participante e a mediana de consenso dos resultados dos participantes. No *Standard Scheme*, o valor σ_{pt} utilizado para calcular os z-scores para todos os parâmetros é **0,35**. Embora os participantes devam

interpretar os seus z-scores no contexto do seu laboratório, estes podem ser interpretados da seguinte forma:

- $z = -1,99$ a $+1,99$ → Satisfatório
 $z = -2$ a $-2,99$ ou $+2$ a $+2,99$ → Questionável
 $z = <-3,00$ ou $>+3,00$ → Não satisfatório

De uma forma geral, recomenda-se que os z-scores que ultrapassem o valor $\pm 2,0$ sejam investigados de forma a esclarecer a causa provável.

Tabela 9 - Resultados obtidos dos ensaios interlaboratoriais realizados no LCQA, para os anos 2015 a 2018

Ano	Ensaio	Resultado esperado	Resultado do LCQA	HPA score para Avaliação do Desempenho	z-score	Resultado 2	z-score	Resultado 3	z-score
2015	Staphylococcus coagulase positiva	$6,95 \times 10^2 - 6,95 \times 10^3$ ufc.g ⁻¹	2700	12 out of 12 (100.0%)	0,26	2600	0,21	2800	0,31
	Staphylococcus coagulase positiva	$1,23 \times 10^3 - 1,23 \times 10^4$ ufc.g ⁻¹	4500	12 out of 12 (100.0%)	0,18	4500	0,18	4700	0,23
2016	Staphylococcus coagulase positiva	$1,5 \times 10^3 - 1,5 \times 10^4$ ufc.g ⁻¹	6800	12 out of 12 (100.0%)	0,49	6700	0,47	7400	0,60
	Staphylococcus coagulase positiva	$1,5 \times 10^3 - 1,5 \times 10^4$ ufc.g ⁻¹	6400	12 out of 12 (100.0%)	0,36	6800	0,44	6200	0,32
2017	Staphylococcus coagulase positiva	<10 ufc.g ⁻¹	<10	10 out of 10 (100.0%)	--	<10	--	<10	--
	Staphylococcus coagulase positiva	$1,2 \times 10^3 - 1,2 \times 10^4$ ufc.g ⁻¹	2900	10 out of 10 (100.0%)	-0,31	3100	-0,22	2800	-0,35
2018	Staphylococcus coagulase positiva	<10 ufc.g ⁻¹	<10	8 out of 10 (80.0%)	--	<10	--	<10	--
	Staphylococcus coagulase positiva	$3,2 \times 10^3 - 3,2 \times 10^4$ ufc.g ⁻¹	14000	10 out of 10 (100.0%)	0,42	13000	0,33	14000	0,42

A participação do LCQA nos ensaios interlaboratoriais também cumpre com o requisito de qualificação do analista para o método, já que a sua participação evidencia o seu desempenho técnico em função dos resultados satisfatórios obtidos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esta dissertação pretendeu-se, apresentar uma metodologia para acreditação do método de pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003, de acordo com os requisitos da NP EN ISO /IEC 17025:2018.

Os requisitos gerais para a acreditação encontram-se na norma internacional "Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e ensaios" (NP EN ISO/IEC 17025: 2018). Assim, os laboratórios que estiverem em conformidade com a norma ISO 17025 demonstram a sua competência para produzir dados e resultados tecnicamente válidos, permitindo melhorar a imagem do laboratório no mercado, bem como a sua viabilidade e credibilidade perante o mesmo, aumentar a sua credibilidade pela garantia da confidencialidade, trabalhar de forma a assegurar decisões imparciais, e aumentar a confiança do cliente aquando da aquisição de um ensaio e/ou calibração acreditado.

A acreditação de laboratórios, é assim um processo fundamental, sendo uma ferramenta decisiva para o reconhecimento oficial das determinações que efetuam.

A elaboração dos procedimentos de ensaio é essencial, descrevendo o procedimento de forma simples e resumida, contendo apenas a informação essencial à sua realização, facilitando a sua consulta pelos técnicos de laboratório, de forma a realizarem corretamente o ensaio, uma vez que as normas de referência descrevem extensivamente todo o procedimento.

A realização destes procedimentos teve sempre como princípio o facto de o LCQA (entidade empregadora) desejar a sua acreditação, possibilitando assim a mim própria ter a simbiose perfeita e real entre o meu trabalho e a realização do meu mestrado.

A concretização deste trabalho permitiu-me ter uma ideia de como se processa a implementação de um método, para futura acreditação, e provou ser uma mais-valia na minha formação académica, profissional e pessoal.

Referências Bibliográficas

- Almeida, J. e Pires, A. (2006). Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração. *Bol Soc Portuguesa Química*; 101:34-9.
- Al-Kandari, D. and Jukes, D. J. (2011). Incorporating HACCP into national food control systems - Analyzing progress in the United Arab Emirates. *Food Control*, 22 (6): 851-861.
- Camargo, P. W. (2018). Principais mudanças na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Inmetro. <http://metrologia.org.br/wpsite/wp-content/uploads/2018/04/Mudan%C3%A7as-na-Norma-ABNT-NBR-ISO-IEC-17025- SBM.pdf>
- Coelho, C. I. P. (2010). Controlo de Qualidade e Gestão Ambiental aplicados a uma Indústria Energética – PEGOP, Coimbra
- EMA-European Medicines Agency. (2011). Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical method validation. European Medicines Agency.
- Eurachem, (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. 2014. ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
- Fusco V., Blaiotta G., Becker K. (2018). Chapter 12 - Staphylococcal Food Poisoning. In *Food Safety and Preservation*. Ed(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, Academic Press.
- Gherardi, G., Di Bonaventura, G., Savini, V. (2018). Chapter 1 - Staphylococcal Taxonomy. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, Academic Press. 1-10.
- Guia IPAC-17025:2018 - Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025:2018. OGC001. 2018-12-31
- Guia Relacre 6 (2007). Acreditação de Laboratórios de Ensaios Microbiológicos, Relacre. Lisboa.
- Guia Relacre 7 (1996). Ensaios Interlaboratoriais em Química, Relacre, IPQ, Portugal.
- Guia Relacre 11 (2006). Elaboração do Manual da Qualidade de Laboratórios, Relacre. Lisboa.
- Haaber, J., Penadés, J. R., Ingmer, H. (2017). Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 25(11): 893–905.
- Hetem, D., Rooijackers, S., Ekkelenkamp, M. (2017). 176 - Staphylococci and Micrococci, *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, Elsevier, 1509-1522.

- Institute of Food Technologists. (2004). Bacteria Associated with Foodborne Diseases. Food Technology Magazine, 58 (7): 20-21.
- IPAC. (2012). Guia interpretativo da NP EN ISO/IEC 17025: Technical report, Instituto Português de Acreditação.
- ISO 16140, (2003). International Standard – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. International Organization for Standardization. Switzerland.
- ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar médium.
- ISO 6887-1:2017 - 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 7218:1996/ Amd. 1: 2001. International Standard – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations – AMENDMENT 1. 2nd Edition. International Organization for Standardization, Switzerland.
- ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations
- Khodabocus, F. &. (2011). Implementation and practical benefits of ISO/IEC 17025: 2005 in a testing laboratory. University of Mauritius Research Journal 17(1): 27-60.
- Lightfoot N. F., M. E. (2003). Análise Microbiológica de Alimentos e Água. Guia para a Garantia da Qualidade. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Miao, J., Chen, L., Wang, J., Wang, W., Chen, D., Li, L., Li, B., Deng, Y., Xu, Z. (2017). Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbial Pathogenesis, **107**: 17–28.
- Morente, E., Ruiz, A., Pulido, R. (2016). Staphylococcus: Detection. Encyclopedia of Food and Health, Academic Press.
- Novais, R. (2010). Microbiologia dos Alimentos. Pp: 523-549. In Microbiologia. Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. F., Lima, N. Lidel, Ida.
- NP ISO 7218 - Microbiologia - Requisitos gerais e orientações para exames microbiológicos. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, Portugal.
- NP 2079:1989 - Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica (2ªedição)

- Norma ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003 - Método da Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva
- OMS-Organização Mundial da Saúde. (2004). Manual de Segurança Biológica em Laboratório (3ª ed.). Genebra: OMS.
- OXOID. (2000). Manual OXOID. 1ª. edição em português.
- Pires, A. R. (2012). Sistemas de Gestão da Qualidade – Ambiente, Segurança, Responsabilidade Social, Indústria, Serviços, Administração Pública e Educação. (E. Sílabo., Ed.) Lisboa.
- Queirós, R. P. (2011). Revisão do Plano de Controlo Interno do Laboratório de Microbiologia. Tese Mestrado, Universidade de Aveiro.
- Raszl, S. O. (2001). HACCP: Instrumento Essencial Para a Inocuidade de Alimentos, Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPRAZ.
- RELACRE – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (2017). A revisão da Norma ISO/IEC 17025:2005. Seminário IPQ/IPAC “A acreditação e o desenvolvimento da qualidade em Portugal”.
- ww1.ipq.pt/PT/Site/Destaques/Documents/IPQ_IPAC/RELACRE_RevISO17025_31012017_IPQ_IPAC.pdf
- Río-Rama, M., Ramírez, A., & Sánchez, A. &. (2015). Factores de éxito para la implantación de la norma UNE-EN-ISO 9001:2008. Estudio regional. Revista TMQ, nº6.
- Santos, J. M. (2008). Sistema Português da Qualidade 25 anos – Passados 25 anos, estará o modelo do SPQ esgotado? . (Editideias, Ed.) Lisboa.
- Santos S. F. (2017). Principais mudanças da ISO/IEC 17025: a visão do Instituto Nacional de Metrologia. Workshop Inmetro. <http://metrologia.org.br/wpsite/wp-content/uploads/2017/08/03-SILVIO-2.pdf>
- Silva, A. P. e Alves, Miriam C. C. (2006). Como iniciar a validação de métodos analíticos. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. São Paulo, Brasil. p. 8-9.
- Silvério, M. J. (2002). J. S. Laboratórios de Portugal - Volume 1 - Laboratórios Acreditados, NPEN ISO/IEC 17025 – Seus requisitos e maiores dificuldades na sua implementação (pp 32-38). Lisboa: Editideias.
- Soares, B. S. (2010). Acreditação de métodos de ensaios e/ou calibração de um laboratório. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.
- Stewart, G. C. (2017). Staphylococcal Food Poisoning. Foodborne Diseases, 367–380.

- Toltzis, P. (2018). *Staphylococcus epidermidis* and Other Coagulase-Negative Staphylococci. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, **4**: 706–712
- Wallin, H.W. (1996). Why Do Food Analysts Need Quality Assurance? *Accreditation and Quality Assurance*, Vol.1 (4): 163-170.
- World Health Organization (WHO). (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014.

Webgrafia:

URL:<http://www.ipac.pt/> , acedido em 10-2018

ANEXOS

A.1 Instrução de trabalho – Pesquisa e Quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003

A.2 Controlo de qualidade interno -controlo bacteriológico do ar e do ambiente

A.3 Procedimento operacional padrão - utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.


A.4 Procedimento operacional padrão - potenciómetro (HI 8424) – utilização, limpeza, manutenção e calibração.

A.5 Instrução de trabalho - controlo e preparação de meios de cultura.

A.6 Instrução de trabalho - reconstituição de culturas de referência

A.7 Ficha de avaliação de formação

A.1 Instrução de trabalho – Pesquisa e Quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-002	Pesquisa e Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	Data aprovação
Página 1 de 4		revisão

1. **TÍTULO:** PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS PELA ISO 6888-2:1999/AMD.1:2003

2. **OBJETIVOS:**

O presente documento destina-se a descrever o procedimento para a pesquisa e quantificação de *Staphylococcus aureus* pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003


3. **CAMPO DE APLICAÇÃO**

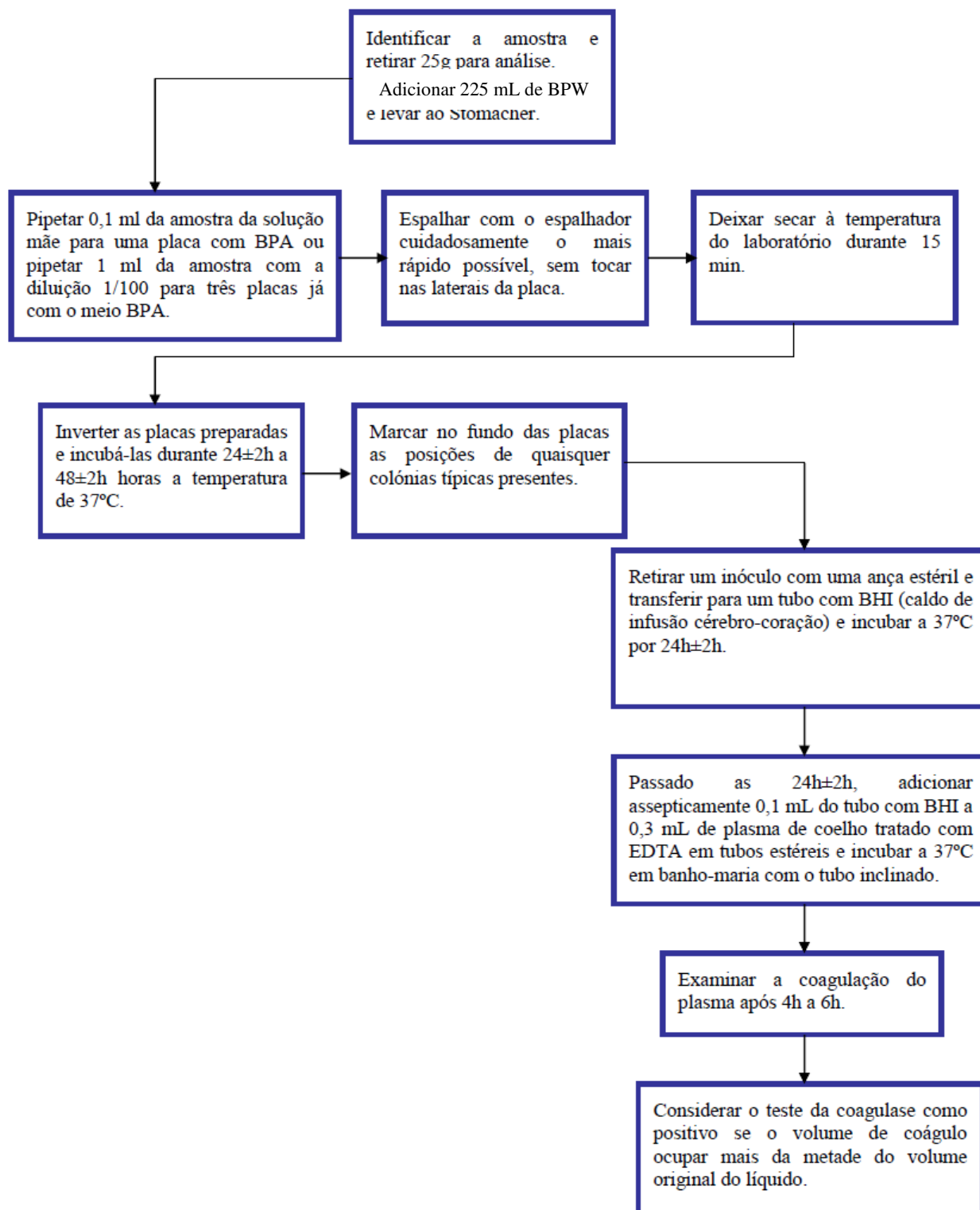
Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Controlo de Qualidade Alimentar, Lda – LCQA, Laboratório de Microbiologia


4. **RESPONSABILIDADES**

O Responsável do Laboratório de Microbiologia e respetivos técnicos, são os responsáveis por implementar e seguir este procedimento, respetivamente.

5. **PROCEDIMENTO**

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-002	Pesquisa e Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	Data aprovação
Página 2 de 4		revisão



	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-002	Pesquisa e Quantificação de Staphylococcus aureus pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	Data aprovação
Página 3 de 4		revisão

5.1. Identificação e preparação da amostra

Em primeiro lugar deve-se identificar a amostra a ser analisada, pesando 25g em seguida. Adiciona-se 225 mL de BPW, leva-se ao Stomacher para homogeneizar e procede-se a análise.

5.2. Sementeira

Pipetar 1 ml da amostra com a diluição 1/100 para duas placas já com o meio BPA. Espalhar com o espalhador cuidadosamente o mais rápido possível, sem tocar nas laterais da placa. Deixar secar a temperatura do laboratório durante 15 min.

Inverter as placas preparadas e incubá-las durante 24±2h a 48±2h horas a temperatura de 37°C.

5.3. Interpretação dos Resultados

Marcar no fundo das placas as posições de quaisquer colónias típicas presentes.

As colónias típicas são pretas ou cinza, brilhantes e convexas e cercadas por uma zona clara (1 mm a 1,5 mm de diâmetro após incubação por 24h e 1,5 mm a 2,5 mm de diâmetro após incubação por 48h).

5.4. Testes de Confirmação

A partir da superfície de cada colónia selecionada, retirar um inóculo com uma ança estéril e transferir para um tubo com BHI (caldo de infusão cérebro-coração) e incubar a 37°C por 24h±2h.

Passado as 24h±2h, adicionar assepticamente 0,1 mL do tubo com BHI a 0,3 mL de plasma de coelho tratado com EDTA em tubos estéreis e incubar a 37°C em banho-maria com o tubo inclinado. Examinar a coagulação do plasma após 4h a 6h.


Considerar o teste da coagulase como positivo se o volume de coágulo ocupar mais da metade do volume original do líquido.

6. Registos

Os resultados são efetuados nas folhas de registos relativas ao microrganismo e método respetivo, incluindo sempre as leituras intermédias (provas de confirmação) para a apresentação do resultado final. Posteriormente é feita a sua transcrição para a aplicação informática.

As folhas de registo são rubricadas por:

- Responsável pela execução da análise;
- Responsável pelas leituras;
- Responsável técnico.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-002	Pesquisa e Quantificação de Staphylococcus aureus pela ISO 6888-2:1999/Amd.1:2003	Data aprovação
Página 4 de 4		revisão

7 BIBLIOGRAFIA

7.1 ISO 6888-2:1999/ Amd.1:2003


7.2 Indicações do fornecedor.

8 ANEXOS

9 HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

A.2 Controlo de qualidade interno - controlo bacteriológico do ar e do ambiente

	Controlo de Qualidade Interno	Data emissão
CQ-001	Controlo Bacteriológico do Ar e do Ambiente.	Data aprovação
Página 1 de 4		revisão

1. **TÍTULO:** PROCEDIMENTO PARA CONTROLO BACTERIOLÓGICO DO AR E DE SUPERFÍCIES.

2. **OBJECTIVOS:**

2.1 Este procedimento aplica-se ao controlo ambiental do laboratório de microbiologia

2.2 Definir os procedimentos para a realizar no controlo ambiental.

2.3 Definir responsabilidades para cada atividade.

3. **CAMPO DE APLICAÇÃO**

Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Controlo de Qualidade Alimentar, Lda – LCQA

4. **RESPONSABILIDADES**

4.1 O Diretor do Laboratório de Microbiologia é o responsável pela implementação deste procedimento, bem como de providenciar medidas corretivas, caso os limites sejam ultrapassados.

4.2 Os técnicos do Laboratório de Microbiologia são responsáveis por seguir este procedimento.

5. **PROCEDIMENTO**

5.1 **Sumário** - A boa qualidade bacteriológica do ar e das superfícies é imprescindível para o controlo de qualidade, já que pode interferir com os resultados analíticos obtidos. Assim, periodicamente a deteção da contaminação microbiana das superfícies e ar ambiente realiza-se por recolha das partículas viáveis na zona de risco, durante a atividade normal deste espaço, utilizando técnicas apropriadas de acordo com um plano de amostragem. As partículas viáveis podem ser recolhidas por contacto direto, sedimentação ou recolha indireta, colocando na placa/zaragatoa o código do local e a data.

5.2 **Ar Ambiente**

5.2.1 O controlo deverá ser feito em função do histórico, pelo que se recomenda uma periodicidade conforme a tabela 1.

5.2.2 A avaliação será feita pelo método passivo o que permitirá uma avaliação quantitativa.

5.2.3 A fim de padronizar a quantificação de aeróbios mesófilos totais, utilizar sempre placas de 9 cm de diâmetro colocadas a um nível de 1 metro do chão e afastadas um metro das paredes e expostas durante 15 minutos (equivalente ao contato com 1 m³ de ar).


5.2.4 Todos os controlos deverão ser feitos em duplicado, utilizando meio PCA (Plate Count Agar) ou outro não seletivo como agar de tripton-soja (TSA).

5.2.5 No início de cada sessão de trabalho registar a temperatura do laboratório e da sala de lavagens/esterilização – no laboratório deve estar entre 22 ±3°C.

5.2.6 Controlar o ar ambiente junto ao local de preparação e distribuição de meios de cultura.

5.2.7 Controlar o ar ambiente junto ao local das sementeiras, tanto para o método de membrana filtrante, como para o método de incorporação, respetivamente junto às rampas de filtração ou junto ao bico de Bunsen.

5.2.8 Controlar o ar ambiente na sala de lavagens e esterilização.

	Controlo de Qualidade Interno	Data emissão
CQ-001	Controlo Bacteriológico do Ar e do Ambiente.	Data aprovação
Página 2 de 4		revisão

- 5.2.9 Realizar a quantificação de aeróbios mesófilos totais abrindo uma placa de Petri, no local selecionado, durante 15 minutos.
- 5.2.10 Incubar em estufa a 30°C±1 durante 72 horas.
- 5.2.11 Os resultados são conformes quando inferiores a 10 UFC por placa (ou seja, resultado limite é inferiores a 3 UFC por placa).
- 5.2.12 **Ações corretivas:** no caso de não conformidade proceder à limpeza e higienização da sala e repetir novamente o procedimento. Se necessário, utilizar um esterilizador do ar.

Quando o resultado não conforme ocorre junto às rampas de filtração, fazer passar o ar por membranas colocadas na rampa de filtração, durante 30 minutos. As placas de PCA com estas membranas vão a incubar a 30°C durante 72 horas. Se a não conformidade voltar a ocorrer, deve-se proceder à esterilização do ar utilizando um esterilizador de ar.

5.3 Câmara de Segurança Biológica


- 5.3.1 O controlo deverá ser feito uma vez por semana
- 5.3.2 Após a limpeza e descontaminação da área de trabalho da cabine com solução de álcool 70% e exposição à luz UV durante 15 minutos, expor 1 placa com meio PCA no interior da câmara com o fluxo de ar ligado e com a UV desligada, durante uma hora.
- 5.3.3 Incubar a 30°C±1 durante 72 horas.
- 5.3.4 Os resultados são conformes quando inferiores a 10 UFC por placa (ou seja, resultado limite é 0 UFC).
- 5.3.5 **Ações corretivas:** proceder à limpeza e higienização da câmara e repetir o procedimento.

5.4 Superfícies

- 5.4.1 Todos os controlos deverão ser feitos em duplicado, utilizando meio PCA (Plate Count Agar), ou outro não seletivo como agar de triptona-soja (TSA).
- 5.4.2 O controlo das bancadas junto às rampas de filtração é feito quinzenalmente após a desinfeção com álcool a 70%.
- 5.4.3 O controlo das restantes superfícies é feito mensalmente após a desinfeção.
- 5.4.4 Pressionar a placa de contacto (tipo RODAC) aberta com meio PCA, durante 10 segundos.
- 5.4.5 Incubar as placas a 30°C±1 durante 72 horas.
- 5.4.6 Os resultados são conformes quando inferiores a 10 UFC por placa (resultado limite inferiores ou igual a 3 UFC por placa).
- 5.4.7 **Ações corretivas:** no caso de não conformidade proceder à limpeza e higienização das superfícies e repetir novamente o procedimento.

5.5 Estufas de incubação

- 5.5.1 Após a desinfeção com álcool a 70%, pressionar uma placa de contacto aberta com meio PCA, durante 10 segundos, em cada prateleira da estufa.
- 5.5.2 Incubar as placas a 30°C±1 durante 72 horas.
- 5.5.3 Os resultados são conformes quando inferiores a 10 UFC por placa (ou seja, resultado limite é inferiores ou igual a 3 UFC por placa).

	Controlo de Qualidade Interno	Data emissão
CQ-001	Controlo Bacteriológico do Ar e do Ambiente.	Data aprovação
Página 3 de 4		revisão

5.5.4 **Ações corretivas:** no caso de não conformidade proceder à limpeza e higienização da estufa e repetir novamente o procedimento.

5.6 Rampa de filtração

5.6.1 O controlo deverá ser feito duas vezes por mês.

5.6.2 A avaliação das condições de esterilidade da rampa de filtração é feita filtrando 100 mL de água destilada esterilizada, em cada um dos filtros da rampa.

5.6.3 Em condições de assepsia colocar os filtros em placas com meio PCA.

5.6.4 Incubar a 30°C±1 durante 72 horas.

5.6.5 Os resultados são conformes quando inferiores a 10 UFC por placa (ou seja, resultado limite é 0 UFC).

5.6.6 **Ações corretivas:** proceder à limpeza e higienização da rampa e repetir o procedimento.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 Boas práticas da OMS para laboratórios de microbiologia farmacêutica. Washington, DC Janeiro 2013.

6.2 WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-fifth report. Geneva: World Health Organization; 2011. (WHO technical report series; 961).

7. ANEXOS


7.1 Registo de controlo bacteriológico da zona de Preparação e distribuição de meios de cultura Anexo 1 (RCQ- 001)

7.2 Registo de controlo bacteriológico da zona de Rampas de filtração Anexo 2 (RCQ- 002)

7.3 ...

Tabela 1. Periodicidade para o controlo bacteriológico do ar e de superfícies, e critérios de aceitação.


Ar ambiente	Periodicidade	Resultados conforme
Preparação e distribuição de meios de cultura	Quinzenalmente	< 10 UFC por placa
Rampas de filtração		
Bico de Bunsen.		
Sala de lavagens e esterilização	Mensalmente	
Câmara de Segurança Biológica	Semanal	< 10 UFC por placa.
Superfícies		
Bancadas junto às rampas de filtração	Quinzenalmente	< 10 UFC por placa.
Restantes superfícies	Mensalmente	
Estufas de incubação	Quinzenalmente	
Rampa de filtração	Mensalmente	< 10 UFC por placa.

	Controlo de Qualidade Interno	Data emissão
CQ-001	Controlo Bacteriológico do Ar e do Ambiente.	Data aprovação
Página 4 de 4		revisão

8. HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

A.3 Procedimento operacional padrão - utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registros das estufas.

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
POP-003	Utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registros das estufas.	Data aprovação
Página 1 de 4		revisão

1. **TÍTULO: UTILIZAÇÃO, LIMPEZA, DESCONTAMINAÇÃO, MANUTENÇÃO, VERIFICAÇÃO E REGISTOS DAS ESTUFAS.**

2. **OBJECTIVOS:**

- 2.1 Este POP aplica-se ao uso das estufas de incubação utilizadas para culturas bacteriológicas, bem como à estufa de secagem e de esterilização:
- 2.2 Padronizar as atividades que envolvem este equipamento.
- 2.3 Definir os procedimentos para a realização da higienização e controlo.
- 2.4 Definir responsabilidades para cada atividade.

3. **DEFINIÇÕES**

- 3.1 Limpeza – Inclui a remoção de sujidades, resíduos e a redução da carga microbológica em equipamentos e superfícies, entre outros.
- 3.2 Higienização – conjunto de operações de natureza física ou/e química (desinfetantes) que visa a eliminação de microrganismos na forma vegetativa a níveis considerados seguros, excetuando-se esporos bacterianos ou suas endotoxinas.
- 3.3 Manutenção de rotina – Todas as atividades de manutenção programadas com determinada frequência e definidas pelo Laboratório de Microbiologia.
- 3.4 Manutenção – Todas as atividades não programadas de manutenção, a serem conduzidas quando são detetados desvios de funcionamento do equipamento.
- 3.5 Verificação – Atividades a serem conduzidas com vista a assegurar que o equipamento se encontra adequado ao seu uso.
- 3.6 Calibração - Conjunto de operações que, em condições específicas, estabelecem a relação entre valores quantitativos indicados por um instrumento de medida, sistema de medição, valores representados por uma medida material ou material de referência e o valor correspondente obtido por padrões.


4. **RESPONSABILIDADES**

- 4.1 O Diretor do Laboratório de Microbiologia é o responsável pela implementação deste procedimento, bem como de providenciar a verificação e calibração do equipamento.
- 4.2 Os técnicos do Laboratório de Microbiologia são responsáveis por seguir este procedimento, manter o equipamento limpo e higienizado, bem como registar qualquer desvio de funcionamento.

5. **PROCEDIMENTO**

5.1 **Sumário** - A estufa de incubação é um equipamento utilizado para a cultura de microrganismos que possam estar presentes nas amostras processadas, a uma temperatura pré-determinada. A verificação deste equipamento é feita com termómetro de máxima e mínima.

A estufa de esterilização e secagem destina-se à esterilização de vidraria necessária nos procedimentos analíticos, bem como à secagem do material.

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
POP-003	Utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.	Data aprovação
Página 2 de 4		revisão

5.2 Descrição dos componentes


- 5.2.1 Respiro: serve para expelir o excesso de calor e manter a uniformidade da temperatura. Antes de ligar é necessário remover a tampa plástica.
- 5.2.2 Lâmpada piloto: quando acesa indica que a estufa está ligada, ao atingir a temperatura desejada a luz apaga-se.
- 5.2.3 Interruptor geral: botão que liga e desliga da corrente
- 5.2.4 Termómetro analógico: indica a temperatura no interior da estufa
- 5.2.5 Controlador eletrónico: Controle programável manualmente da temperatura
- 5.2.6 Dispositivo de imobilização do termóstato: permite bloquear uma temperatura selecionada
- 5.2.7 Termostato de segurança: desliga a estufa quando se ultrapassa temperatura pré-definida
- 5.2.8 Pega de porta: permite abrir/fechar a porta exterior da estufa
- 5.2.9 Porta exterior: porta em aço inoxidável
- 5.2.10 Porta interior: porta de vidro temperado localizada interiormente antes da porta exterior.
- 5.2.11 Bandejas perfuradas: bandejas em aço inoxidável ajustáveis em altura

5.3 Utilização da estufa de incubação

- 5.3.1 Colocar a estufa numa superfície plana e robusta longe de locais com risco de incêndio ou explosão.
- 5.3.2 Ligar a uma ficha terra, de acordo com as especificações de tensão e potência do equipamento (etiqueta na parte de trás da estufa).
- 5.3.3 Acionar o interruptor geral para ligado (1), acendendo a luz piloto
- 5.3.4 Regular o termostato para a temperatura programada, desbloqueando o dispositivo de imobilização.
- 5.3.5 Regular o termostato de segurança para a temperatura máxima de segurança.
- 5.3.6 Ao atingir a temperatura programada, a lâmpada piloto apaga.
- 5.3.7 Colocar o termómetro no orifício localizado acima da estufa ou no seu interior -controlo de temperatura
- 5.3.8 Estas estufas destinam-se exclusivamente para incubações bacteriológicas, sendo o limite de tolerância de ± 1 °C.
- 5.3.9 O uso das estufas obriga ao preenchimento nos respetivos Registos de utilização

5.4 Acondicionamento do material nas estufas de incubação

- 5.4.1 Todo o material que vai para a estufa deverá estar corretamente identificado.
- 5.4.2 As placas são incubadas invertidas.
- 5.4.3 Não sobrepor mais que cinco placas para garantir uma uniformidade de distribuição de temperatura.
- 5.4.4 Não colocar material no chão da estufa, mas sim nas prateleiras. Não colocar material encostado às paredes, nem a tocar no teto da estufa, deixar no mínimo um espaço de 3 cm.
- 5.4.5 Os tubos devem ser levados em suportes próprios que permitem uniformidade de distribuição de temperatura.

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
POP-003	Utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.	Data aprovação
Página 3 de 4		revisão

5.4.6 De um modo geral, os materiais (p.e saquetas) devem de estar separados de tal forma que o ar quente consiga circular entre eles.

5.5 Utilização da estufa de esterilização

5.5.1 Proteger a vidraria com papel pardo (placas de Petri, pipetas, erlenmeyers, etc).

5.5.2 A temperatura e o tempo de esterilização deverão ser no mínimo: 160º/120'; 170º/60'; 180º/30'.

5.5.3 O papel adquire cor parda, que não deve ser em demasia, nem deve ficar quebradiço.

5.5.4 Abrir a estufa só após arrefecimento – a entrada do ar mais frio pode levar à quebra do material.

5.6 Higienização e Manutenção

5.6.1 A limpeza e higienização é feita quinzenalmente ou sempre que necessário.

5.6.2 Desligar a estufa da corrente elétrica.

5.6.3 Remover as prateleiras e com um pano macio e umedecido em água morna, passar levemente na câmara interna. Não utilizar qualquer outro produto para limpeza. Cuidado com o sensor de temperatura na parte interna da câmara.

5.6.4 Lavar as prateleiras com solução de detergente neutro diluída a 2%, passar abundantemente em água corrente até completa remoção da solução detergente. Deixar secar.

5.6.5 Posteriormente passar um toalhete de papel /gaze umedecida com álcool 70%, tanto nas prateleiras como no interior das estufas.

5.6.6 Deve-se cuidar para não derramar nenhum produto dentro da estufa. Se tal acontecer limpar com pano umedecido em detergente neutro. Retirar toda a espuma com um pano enxaguado várias vezes em água limpa. No final passar um pano umedecido com álcool 70%.

5.6.7 Após higienização ligar novamente a estufa.

5.6.8 Fazer o registo de higienização no respetivo Registo de higienização – técnico responsável, data, hora e soluções utilizadas.

5.7 Verificação

5.7.1 Sempre que a estufa está em uso é feita a monitorização em contínuo da temperatura por um termómetro analógico (5.3.7).

5.7.2 Registrar a temperatura observada no interior da estufa diariamente, utilizando o respetivo Registo de verificação

5.8 Calibração


5.8.1 A calibração da estufa deverá ser feita antes da entrada em funcionamento e posteriormente de 3 em 3 anos, por laboratório de calibração acreditado, por forma a garantir que a estufa está a operar dentro das especificações.

5.8.2 Uma vez calibrado, o equipamento deve ter uma afixada uma etiqueta com a data da calibração e a data da próxima calibração.

6. BIBLIOGRAFIA

6.1 VIM: 1993 ISO International vocabulary of basic and general terms in metrology

6.2 Manual de Instrução da estufa Raypa modelo I-40

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
POP-003	Utilização, limpeza, descontaminação, manutenção, verificação e registos das estufas.	Data aprovação
Página 4 de 4		revisão

6.3 Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. 2004. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

6.4 Guia RELACRE 6 – Edição 2, junho 07. Acreditação de laboratórios de ensaios microbiológicos

7. ANEXOS

7.1 Registo de utilização da estufa de incubação RAYPA, MODELO I-40 (incubações a 30°C) FORM 004

7.2 Registo de higienização da estufa de incubação RAYPA, MODELO I-40 (incubações a 30°C) FORM 005


7.3 Registo de verificação de temperatura da estufa de incubação RAYPA, MODELO I-40 FORM 006

...

8 HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

A.4 Procedimento operacional padrão - potenciómetro (HI 8424) – utilização, limpeza, manutenção e calibração.

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
PT-006	Potenciómetro (HI 8424) – Utilização, limpeza, manutenção e calibração	Data aprovação
Página 1 de 3	Nº Património:	revisão

1. TÍTULO: POTENCIÓMETRO (HI 8424) – UTILIZAÇÃO, LIMPEZA, MANUTENÇÃO E CALIBRAÇÃO

2. OBJECTIVOS:

- 2.1 Este POP aplica-se à utilização do potenciómetro.
- 2.2 Padronizar as atividades que envolvem este equipamento.
- 2.3 Definir os procedimentos para o seu uso, calibração e manutenção
- 2.4 Definir responsabilidades para cada atividade.

3. DEFINIÇÕES

- 3.1 Limpeza – Inclui a remoção de sujidades, resíduos e a redução da carga microbológica em equipamentos e superfícies, entre outros.
- 3.2 Manutenção de rotina – Todas as atividades de manutenção programadas com determinada frequência e definidas pelo Laboratório de Microbiologia.
- 3.3 Manutenção – Todas as atividades não programadas de manutenção, a serem conduzidas quando são detetados desvios de funcionamento do equipamento.
- 3.4 Verificação – Atividades a serem conduzidas com vista a assegurar que o equipamento se encontra adequado ao seu uso.
- 3.5 Calibração - Operação que visa assegurar a confiabilidade do equipamento, por meio da comparação do valor medido com um padrão rastreado ao SI, levando-o por isso a uma condição de desempenho e ausência de erros sistemáticos, adequados ao seu uso.

4. RESPONSABILIDADES

- 4.1 O Diretor do Laboratório de Microbiologia é o responsável pela implementação deste procedimento.
- 4.2 Os técnicos do Laboratório de Microbiologia são responsáveis por seguir este procedimento, bem como registar qualquer desvio de funcionamento.


5. PROCEDIMENTO

5.1 **Sumário** – o HI 8424 é um pH/mV/°C microprocessador portátil. Apresenta calibração automática com 3 soluções tampão memorizadas (pH 7,01, 4,01 o 10,01).

5.2 Utilização

5.2.1 **Primeira utilização**

- 5.2.1.1 Retire a tampa de proteção e se existirem depósitos de sal passe por água.
- 5.2.1.2 Agite o eléctrodo como se tratasse de um termómetro de vidro, de modo a remover quaisquer bolhas de ar que estejam dentro do eléctrodo.

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
PT-006	Potenciômetro (HI 8424) – Utilização, limpeza, manutenção e calibração Nº Património:	Data aprovação
Página 2 de 3		revisão

5.2.1.3 Se o bolbo e/ou a junção estão secos, mergulhe a extremidade do elétrico numa solução de armazenamento ou solução padrão pH 7 ou pH 4, pelos menos durante uma hora antes de o utilizar.

5.2.1.4 Ligue o elétrico ao medidor.

5.2.2 Calibração

5.2.1 Usar soluções-tampão comerciais com o certificado de qualidade: soluções tampão pH 7,01 (HI 7007 ou HI 8007) e pH 4,01 (HI 7004 ou HI 8004) para analisar amostras ácidas e soluções tampão pH 7,01 e pH 10,01 (7010 HI ou HI 8010) para as amostras alcalinas.

5.2.2 A calibração é feita diariamente

5.2.3 Pressione a Tecla ON para ligar o aparelho.

5.2.4 Enxaguar o elétrico e a sonda de temperatura com água desionizada e limpar suavemente com papel absorvente.

5.2.1 Mergulhar o elétrico e a sonda na solução de pH 7,01 e esperar agitando suavemente até ao equilíbrio térmico. Acione a tela RANGE para visualizar a medição do pH.

5.2.5 Acione tecla CAL. Será visualizado o valor da solução tampão 7,01 quando a temperatura é compensada. Quando não tem a função de temperatura compensada o valor será 7,03. Espere até o valor de pH deixar de piscar.

5.2.6 Se aparecer "E4, a solução de calibração é errada ou fora de especificação e deve ser substituída.

5.2.2 Pressione CFM. O símbolo "E5" indica que a deriva de calibração esta completa.

5.2.3 Lavar o elétrico e a sonda de temperatura antes da imersão em solução de 4,01/pH 10,01, e esperar agitando suavemente até ao equilíbrio térmico.

5.2.4 O símbolo "E5" irá ser substituído pelo valor de pH a piscar.

5.2.5 Espere até que o símbolo pH pare de piscar. Pressione CFM para confirmar a calibração.

5.2.6 O elétrico está pronto para efetuar as medições.


5.2.3 Medição

5.2.3.1 Enxague a extremidade do elétrico com água destilada ou desionizada. De seguida e para uma resposta mais rápida e de modo a evitar contaminação cruzada, enxague a extremidade com algumas gotas da solução a ser testada.

5.2.3.2 Mergulhe a extremidade na amostra, agite cuidadosamente e aguarde que a leitura estabilize.

5.2.3.3 A sonda de temperatura pode ser utilizada independentemente para tomar medições de temperatura, ou em conjunção com o elétrico de pH - função ATC.

5.2.4 Manutenção e Limpeza

	Procedimento Operacional Padrão Laboratório de Microbiologia	Data emissão
PT-006	Potenciômetro (HI 8424) – Utilização, limpeza, manutenção e calibração Nº Património:	Data aprovação
Página 3 de 3		revisão

- 5.2.4.1 O bulbo de vidro do eléctrodo de pH e a junção devem estar sempre hidratados. Assim, colocar a tampa de protecção com algumas gotas de solução de armazenamento.
- 5.2.4.2 Nunca armazenar o eléctrodo em água destilada ou desionizada.
- 5.2.4.3 Após utilizar o eléctrodo enxaguar com água limpa, guardando-o de acordo com ponto 5.2.4.1.
- 5.2.4.4 Limpar o eléctrodo periodicamente, deixando-o mergulhado durante 10 a 15 minutos em solução de limpeza.
- 5.2.4.5 Quando o nível da solução referência estiver 1 cm abaixo do orifício de medição, desapeerte a ficha de modo a expor o orifício e adicione mais solução electrolítica referência com uma seringa. Manter o eléctrodo na horizontal de modo a obter um nível acima do orifício de medição e volte a colocar a ficha quando terminar.
- 5.2.4.6 Inspeccionar o eléctrodo vendo se existem quaisquer arranhões ou quebras no bulbo ou haste – em caso afirmativo substitua-o

6 BIBLIOGRAFIA

- 6.1 Manual de Instrucciones- HI 8014 - HI 8314 - HI 8424 - HI 8915 - HI 9214 - HI 931000- HI 9622 pHmetros Portátiles. Versão 3/97


7 ANEXOS

Não aplicável

8 HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

A.5 Instrução de trabalho - controlo e preparação de meios de cultura.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 1 de 7		revisão

1. **TÍTULO:** CONTROLO E PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

2. **OBJETIVOS:**

O presente documento destina-se a descrever o modo como os meios de cultura são preparados, desde a pesagem até ao uso no laboratório de Microbiologia.

Todos os registos são mantidos no Laboratório.

3. **CAMPO DE APLICAÇÃO**

Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Controlo de Qualidade Alimentar, Lda – LCQA, Laboratório de Microbiologia

4. **DEFINIÇÕES**

Não aplicável

5. **RESPONSABILIDADES**

O Responsável do Laboratório de Microbiologia, e respetivos técnicos, são os responsáveis por implementar e seguir este procedimento, respetivamente.

6. **PROCEDIMENTO**

6.1 Pesagem do meio de cultura

Pesar a quantidade de meio de cultura desidratado indicada na tabela do **ANEXO I**, ou consultar o rótulo do frasco do meio de cultura, ou a quantidade de cada um dos ingredientes indicada na respetiva norma em função do volume de meio de cultura que se quer preparar.

6.2 Distribuição dos meios de cultura

Os meios de cultura são distribuídos de acordo com o referido na tabela **ANEXO II**.

6.3 Dissolução do meio de cultura

Dissolução sem aquecimento: Alguns meios de cultura não necessitam de qualquer tipo de dissolução, seguindo apenas as indicações do fabricante quanto aos tempos de espera antes de serem esterilizados.


Dissolução com aquecimento: feita no microondas, ou no banho-maria em ebulição, lentamente para evitar sobreaquecimento. É necessário ir agitando o recipiente ou mexendo com uma vareta regularmente.

6.4 Esterilização do meio de cultura

Esterilização por calor húmido: Ver tabela do **ANEXO II**.

Esterilização por ebulição: Alguns meios de cultura mais sensíveis ao calor não podem ser esterilizados na autoclave, sendo sujeitos apenas a uma ebulição, segundo indicação do fabricante ou da norma respetiva.

Assim, colocar o meio de cultura perfeitamente homogeneizado no microondas ou em banho-maria a uma potência baixa. Deixar aquecer lentamente até à ebulição, agitando várias vezes. Colocar o meio de cultura imediatamente em banho de água a aproximadamente $45 \pm 1^\circ\text{C}$ e distribuir em placas assim que atinja esta temperatura.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 2 de 7		revisão

6.5 Distribuição de meios de cultura esterilizados

Os meios de cultura para plaquear são distribuídos assepticamente por placas de diâmetro adequado, de acordo com a tabela **ANEXO II** de modo a obter uma espessura apropriada ao crescimento de microrganismos. As placas são deixadas a secar tapadas numa superfície fria e horizontal.

6.6 Identificação do meio de cultura/lote

Todos os meios de cultura ou reagentes preparados são identificados com o nome, a data de preparação e rubrica do responsável, acompanhado sempre com um número de lote sequencial (data/nome/número) (ex. 25.11.10/TGT/1), para haver rastreabilidade do mesmo.

6.7 Condições de armazenamento

O período de vida útil dos meios de cultura depende das suas características. Normas específicas, normas nacionais ou internacionais podem prever condições específicas de vida máxima de prateleira.

Armazenar os meios de cultura em condições que impeçam qualquer modificação da sua composição, isto é, ao abrigo da luz e à dissecação e num frigorífico a $(5 \pm 3)^\circ \text{C}$, se necessário.

É geralmente recomendado 4 semanas de armazenamento para placas e 6 meses para frascos e tubos, exceto quando especificado em normas específicas ou resultados do laboratório de validação.

A data de validade para meios armazenados encontra-se estabelecida na tabela em **ANEXO II**. Antes de qualquer utilização observar sempre qualquer alteração de cor, sinal de evaporação/desidratação ou crescimento microbiano. Lotes de meios que mostram tais mudanças não devem ser utilizados.

Antes de ser utilizado ou antes de mais aquecimento, recomenda-se que os meios de cultura sejam equilibradas à temperatura ambiente.

6.8 Utilização do meio de cultura sólido em frasco

Fundir o meio de cultura, colocando-o no microondas a baixa potência, de seguida colocar em repouso à temperatura ambiente durante um curto período de tempo, (ex. 2 minutos), para evitar a quebra do vidro.

Arrefecer o meio fundido a uma temperatura de $45 \pm 1^\circ \text{C}$ num banho de água controlado termostaticamente. O tempo necessário para se atingir $45 \pm 1^\circ \text{C}$ depende do tipo de meio de cultura, do volume e o do número de unidades no banho. Deste modo, o controlo de temperatura no interior dos frascos colocados no banho é feito verificando uma sonda de temperatura dentro de um frasco semelhante ao utilizado. Evitar sempre o sobreaquecimento.

O meio fundido deve ser utilizado o mais breve possível (posto em placas imediatamente á sua fundição) e recomenda-se que o mesmo não seja mantido mais do que 4 horas no banho.


O meio não será novamente guardado nem fundido para uso posterior.

6.9 Controlo de qualidade

O controlo de qualidade dos meios de cultura encontra-se exemplificado no **Anexo II**

6.9.1 Controlo positivo e negativo

O controlo positivo e negativo efetua-se a fim de garantir que o meio realmente funciona de acordo com as informações dadas pelo fabricante.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 3 de 7		revisão

Utiliza-se como controlo positivo do meio, uma cultura pura da bactéria que queremos pesquisar nesse meio, cultura essa que terá de apresentar as características típicas inerentes ao crescimento dessa bactéria nesse mesmo meio de cultura.

Como controlo negativo do meio, utiliza-se uma cultura pura de uma bactéria cujas colónias nesse meio de cultura apresentem características diferentes da cultura usada no controlo positivo, ou que não cresça.

Para se fazer esse controlo as bactérias após a sua reconstituição e incubação inicial (placa original) têm de ser mantidas no frigorífico até á nova reconstituição da cultura (consultar IT-002).

Semanalmente tem de se renovar a bactéria em meio nutritivo e é a partir desta é que se efetuam todo o tipo de controlos e confirmações, caso isto não seja possível vai-se á placa original repicar a bactéria.

Fazer uma estria à superfície do meio de cultura, incubando-se de acordo com o método (utiliza-se uma placa dividida ao meio, um lado para o controlo positivo e o outro para o controlo negativo, no caso de tubos utiliza-se um tubo para o controlo positivo e outro para o controlo negativo). Observam-se e registam-se os resultados.

6.9.2 Controlo de esterilidade

O controlo de esterilidade serve para verificar a esterilidade do meio de cultura.

Após preparação do meio de cultura escolhe-se uma placa ou um tubo que se incuba à temperatura de $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ durante 2-5 dias. Ao fim deste tempo, não deverá haver qualquer crescimento no meio, caso contrário o lote é rejeitado.

Regista-se o resultado.

6.9.3 Controlo de pH

Determina-se o pH do meio de cultura regista-se o valor.

O meio é rejeitado caso o valor de pH se encontre fora dos limites especificados.

6.10 Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação é realizado sempre que se utilize um novo lote de meio de cultura ou haja algum indício de alteração da qualidade do meio.

Inocular em triplicado o meio em estudo e o meio não seletivo (PCA), dividindo o volume de uma lenticula em partes iguais, incubar segundo o respetivo procedimento operativo.

A recuperação do microrganismo alvo deve ser de pelo menos 66% do resultado obtido no meio de cultura não seletivo e é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Ensaio de Recuperação (ER)} = (N_0 / N_s) * 100$$


$$\text{ER} \geq \text{CA} = 66 \%$$

Em que:

N_s – número total de colónias obtido no meio de cultura não seletivo.

N_0 – número total de colónias obtido no meio de cultura em estudo.

CA – Critério de aceitação de 66%.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 4 de 7		revisão

Estes resultados registam-se na folha de registos originais.

7 BIBLIOGRAFIA

- 7.1 NP 2079 – Regras gerais para análise microbiológica.
- 7.2 ISO 7218 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations.
- 7.3 Standard Methods - (SMEWW) - 20ª Edição:1998;
- 7.4 ISO/TS 11133:2014 – Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — **Part 1**: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
- 7.5 ISO/TS 11133:2014 – Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — **Part 2**: Practical guidelines on performance testing of culture media.

8 ANEXOS

- 8.1 **Anexo I** – Tipos de meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia do LCQA e respetivamente fornecedor e propriedades seletivas do meio.
- 8.2 **Anexo II** – Condições de esterilização, de armazenamento e controlo de qualidade a efetuar nos meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia do LCQA
- 8.3 FORM-001.001 **Modelo de Impresso de Registo de Utilização de Equipamento ou Instrumento de Medição**


9 HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 5 de 7		revisão


Anexo I – Tipos de meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia do LCQA e respetivamente fornecedor e propriedades seletivas do meio

Meio de cultura	Marca Referência	Modo de ação	Quantidade (g/L)	Suplemento/Reagentes (g/L)	Tipo dissolução
Slanetz and Bartley (SB)	HIMEDIA Ref. M812-I	A azida de sódio vai inibir o crescimento de toda a flora microbiana que seja G ⁻ . Os Enterococos reduzem o TTC, formando 1 composto vermelho de formazina, implicando que as colónias vão apresentar coloração avermelhada.	48,50 g/L	-----	QUENTE
Baird Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (BPA, RPF)	MERCK Ref. 79883	O meio contém lítio e telurito, que inibe a maioria da microflora contaminante, enquanto a glicina e o piruvato aumentam o crescimento de estafilococos. Os estafilococos podem reduzir o telurito a telureto, o que resulta na coloração cinza a preto das colónias. O fibrinogénio plasmático de coelho é usado para a deteção da atividade da coagulase.	70 g/L	RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) Ref. 05939	QUENTE
Plate Count Agar (PCA)	HIMEDIA Ref. M091	O crescimento da maior parte dos microrganismos é favorecido pela presença de substâncias nutritivas fornecidas pela triptona e pelos fatores de crescimento do extrato de levedura.	23,5 g/L	-----	QUENTE
Manitol Salt Agar (MSA)	HIMEDIA Ref. M118	Apenas os microrganismos que apresentam tolerância ao NaCl, tais como os estafilococos, conseguem crescer neste meio, devido à sua elevada concentração neste sal. A degradação do manitol em ácido estabelece mais ou menos uma relação com a patogenicidade do <i>Staphylococcus aureus</i> , o que vai servir como indicador para esta espécie.	111 g/L	-----	QUENTE
...					


	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 6 de 7		revisão

Anexo II – Condições de esterilização, de armazenamento e controlo de qualidade a efetuar nos meios de cultura usados no Laboratório de Microbiologia do LCQA

Meio de cultura	Distribuição	Tipo de Esterilização	Armazenamento			Controlo da Qualidade		pH (25°C)
			Placas de Petri 60 mm Ø	Tubos	Frasco	Controlo positivo	Controlo negativo	
Slanetz and Bartley (SB)	Placas	Ebulição	4 Semanas 5±3°C	—	—	<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	7,2±0,2
Baird Parker Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (BPA, RPF)	Placas	121°C / 15'	4 Semanas 5±3°C	—	—	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	7,2±0,2
Plate Count Agar (PCA)	Frascos 500mL	121°C / 15'	4 Semanas 5±3°C	—	6 Meses 5±3°C	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	—	7,2±0,2
Manitol Salt Agar (MAS)	Placas	121°C / 15'	4 Semanas 5±3°C	—	6 Meses 5±3°C	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	7,2±0,2
Água Peptonada Tamponada	Tubos ou frasco de Shott 100 ou 250 mL	121°C / 15'	—	6 Meses 5±3°C	6 Meses 5±3°C	<i>Escherichia coli</i> NCTC 9001	—	7,2±0,2


	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-001	Controlo e Preparação de Meios de Cultura	Data aprovação
Página 7 de 7		revisão

FORM-001.001 Modelo de Impresso de Registo de Utilização de Equipamento ou Instrumento de Medição

	Laboratório <i>de Microbiologia</i>	Data:
FORM-001	Registo de utilização <i>da balança analítica Kern ABJ</i> Nº Património:	Página:

Nome	Data	Hora	Substância	Massa pesada (g)	Atividade	Observações
Assinatura do responsável pelo laboratório						Data

A.6 Instrução de trabalho - reconstituição de culturas de referência

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-003	Reconstituição de Culturas de Referência	Data aprovação
Página 1 de 5		revisão

1. TÍTULO: RECONSTITUIÇÃO DE CULTURAS DE REFERÊNCIA

2. OBJETIVOS:

O presente documento destina-se a descrever as ações necessárias para a reconstituição de Culturas de Referência (CR) ou derivados comerciais equivalente, para utilização nos controlos positivos e negativos. Para demonstrar a rastreabilidade, os laboratórios devem usar estirpes de referência de microrganismos obtidos diretamente de uma coleção reconhecida nacional ou internacional, quando exista. Em alternativa podem ser usados derivados comerciais para os quais tenha sido demonstrado, pelo laboratório, serem equivalentes em todas as características relevantes, nas condições de utilização.

3. CAMPO DE APLICAÇÃO

O uso de CR em Microbiologia é uma ferramenta fundamental para verificar o desempenho dos ensaios executados na rotina do Laboratório. Idealmente, o seu uso deve fazer parte de um programa de Controlo de Qualidade definido, juntamente com a participação de Ensaio Interlaboratoriais. O uso de CR aplica-se a controlos positivos e negativos em série de amostras e para testes confirmativos.

Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Controlo de Qualidade Alimentar, Lda – LCQA, Laboratório de Microbiologia

4. DEFINIÇÕES

As culturas de referência consistem em microrganismos classificados por género e espécie, catalogados e descritos de acordo com suas características e origem (ISO 11133-1:2000).

5. RESPONSABILIDADES

O Responsável do Laboratório de Microbiologia e respetivos técnicos, são os responsáveis por implementar e seguir este procedimento, respetivamente.

6. PROCEDIMENTO

6.1 Fornecedor

As CR devem ser adquiridas em Centros de Referência como p.e. ATCC (American Type Culture Collection), NCTC (National Collection of Type Cultures), etc. Os derivados comerciais podem ser adquiridos nos laboratórios comuns de venda de consumíveis

6.2 Manutenção

A conservação dos "stocks" de referência deverá ser feita em alíquotas ultracongeladas ou liofilizadas.


As estirpes de referência podem ser subcultivadas uma vez para obter "stocks" de referência. As culturas de trabalho para serem usadas na rotina devem ser previamente subcultivadas a partir do "stock" de referência (veja-se Anexo A – preparação de "stocks" de trabalho).

Se o "stock" de referência tiver sido descongelado, não podem ser recongelados e reutilizados.

Os "stocks" de trabalho não devem ser subcultivados, excepto se tal for requerido e definido por um método normalizado ou se os laboratórios puderem documentar, que não houve alteração de nenhuma característica relevante.

Os "stocks" de trabalho não devem ser subcultivados para substituir "stocks" de referência.

Os derivados comerciais de estirpes de referência só devem ser usados como culturas de trabalho.

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-003	Reconstituição de Culturas de Referência	Data aprovação
Página 2 de 5		revisão

6.3 Diluentes

Água Peptonada Tamponada;

MR-Maximum Recovery Broth (Caldo de recuperação máxima);

Água esterilizada

6.4 Meios líquidos diretos

Retirar o tubo (lenticula) a utilizar do congelador (-20±5,0) °C;

Deixar atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 15 a 20 minutos);

Para um frasco esterilizado de 100 mL, medir 100 mL de diluente;

Verter a lenticula para o frasco (com 100 mL de diluente);

Repousar à temperatura ambiente (aproximadamente 10 a 15 minutos), para rehidratar, verificando sempre se a lenticula está completamente dissolvida;

Depois de dissolver agitar durante 15 segundos cerca de 30 vezes;

A lenticula está pronta a utilizar de acordo com os métodos a testar.

6.5 Meios líquidos indiretos (diluições das lenticulas)

Retirar o tubo (lenticula) a utilizar do congelador (-20±5,0) °C;

Deixar atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 15 a 20 minutos);

Proceder de acordo com o documento auxiliar DA14;

A lenticula está pronta a utilizar de acordo com os métodos a testar.

6.4 Meios sólidos

Retirar o tubo (lenticula) a utilizar do congelador (-20±5,0) °C;

Deixar atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 15 a 20 minutos);

Reconstituir no meio pretendido deixando repousar à temperatura ambiente (aproximadamente 10 a 15 minutos);

Adicionar o meio pretendido pelo método de incorporação ou espalhamento de acordo com o método a analisar.

6.5 Registos

Os resultados são efetuados nas folhas de registos relativas ao microrganismo e método respetivo, incluindo sempre as leituras intermédias (provas de confirmação) para a apresentação do resultado final. Posteriormente é feita a sua transcrição para a aplicação informática.


As folhas de registo são rubricadas por:

- o Responsável pela execução da análise;
- o Responsável pelas leituras;
- o Responsável técnico.

7 BIBLIOGRAFIA

7.1 Indicações do fornecedor.

7.2 Guia Relacre 6 – 2ª Edição. Acreditação de Laboratórios de Ensaios Microbiológicos


	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-003	Reconstituição de Culturas de Referência	Data aprovação
Página 3 de 5		revisão

8 ANEXOS

8.1 Anexo A – preparação de “stocks” de trabalho

9 HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Finalidade	Revisão requer formação?	Elaboração	Aprovação
00	Xx/xx/19	Emissão inicial	S	Responsável Qualidade	Diretor Geral

	Instrução de Trabalho	Data emissão
IT-003	Reconstituição de Culturas de Referência	Data aprovação
Página 4 de 5		revisão

Anexo A – preparação de “stocks” de trabalho

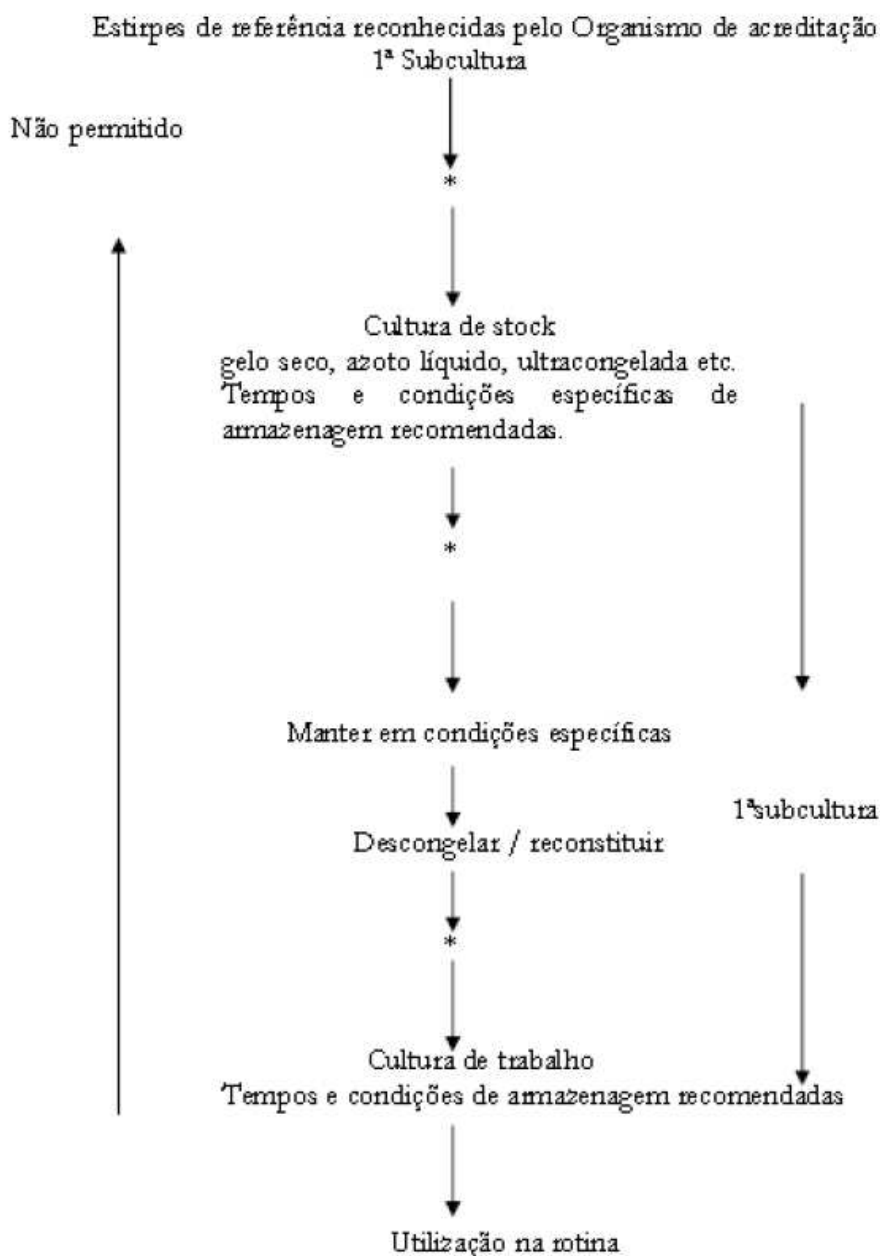



Figura 1. Preparação de “stocks” de trabalho, à custa de culturas de referência. (Adaptado de: Guia Relacre, 2006)

A.7 Ficha de avaliação de formação

	Ficha de Avaliação da Formação	Mod-010
---	--------------------------------	---------

DADOS PESSOAIS	
NOME E APELIDO	

DADOS GERAIS DA ATIVIDADE		
DENOMINAÇÃO		
MINISTRADA POR		Data _____ Local (horas) _____

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE				
	Muito Boa	Boa	Razoável	Má
1. Utilidade da Ação de Formação				
2. Documentação apresentada				
3. Adaptação ao nível e necessidade do grupo				
4. Organização, Coordenação e Duração				
5. Explicações teóricas				
6. Explicações práticas				
7. Meios técnicos utilizados				
8. Avaliação Global				

SUGESTÕES E PROPOSTAS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA AÇÃO DA FORMAÇÃO (preencher pelo GC ou RT)	
<input type="checkbox"/> Aproveitamento adequado serviu para melhorar no seu posto de trabalho;	Data e Assinatura (GQ):
<input type="checkbox"/> Necessidade de ampliar a formação;	
<input type="checkbox"/> Aproveitamento inadequado, pouco melhorou o seu posto de trabalho;	