

## Ensaio de Proficiência Interlaboratorial para Contagem de Células Somáticas em Leite

Foto: Maria Edi Rocha Ribeiro



Denilson Anthonisen<sup>1</sup>  
Maria Edi Rocha Ribeiro<sup>2</sup>

As células somáticas presentes no leite compreendem as células brancas ou leucócitos e as células epiteliais. Os leucócitos são produzidos quando há processos inflamatórios, enquanto as células epiteliais, produtos de descamação, são geradas em processos naturais de reposição de células no interior da glândula mamária ou em lesões físicas (LEITE, 2006; NORO et al., 2006). Sendo assim, a contagem de células somáticas (CCS) constitui-se num importante indicador do estado sanitário da glândula mamária e, conseqüentemente, da qualidade do leite produzido pelos rebanhos leiteiros (PAULA, et al., 2004).

Por outro lado, a publicação da Instrução Normativa 51/02 (BRASIL, 2002) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, constituiu um marco transformador para o setor laticinista, pois definiu novas regras para a avaliação da qualidade do leite cru refrigerado no Brasil. No documento, estabeleceu-se que, em estabelecimentos sob fiscalização federal, a composição (gordura, proteína e sólidos totais), a contagem bacteriana total (CBT), a contagem de células somáticas (CCS) e os resíduos de drogas veterinárias devem ser monitorados, no leite cru e

processado. Cabe destacar que estas determinações deverão ser realizadas por laboratórios credenciados pelo MAPA (EVANGELISTA, 2008).

É condição determinante para o credenciamento de laboratórios pelo MAPA o cumprimento da legislação vigente e o atendimento aos requisitos de normas da qualidade, ABNT NBR ISO/IEC 17.025 ou Boas Práticas de Laboratório (BPL), conforme estabelece a Instrução Normativa 01/07 (BRASIL, 2007).

Entre os requisitos da ISO/IEC 17.025, o item 5.4.5 versa sobre a validação de métodos. Destaca-se neste item a necessidade do processo de validação ser suficientemente abrangente para atender a aplicação a que se destina. Em nota, a ABNT (2005) sugere que para determinar o desempenho de um método aplique-se uma ou mais das seguintes técnicas: calibração com padrão ou material de referência, comparação de resultados com métodos diferentes, comparações interlaboratoriais, avaliação sistemática dos fatores que interferem no resultado e avaliação da incerteza

<sup>1</sup> Bacharel em química; Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial; Analista da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, denilson@cpact.embrapa.br

<sup>2</sup> Médica Veterinária; Mestre em Veterinária; Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, dindi@cpact.embrapa.br

de medição.

Segundo Ponçano (2005), a qualidade de um resultado laboratorial está vinculada ao atendimento de requisitos de normas da qualidade voltadas ao reconhecimento e à acreditação de laboratórios.

Dentre os recursos importantes para obter resultados confiáveis dispõe-se dos programas de comparação interlaboratorial e, dentre eles, os ensaios de proficiência que permitem uma avaliação direta do desempenho laboratorial.

O objetivo do trabalho foi avaliar o desempenho do Laboratório da Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado no Programa Interlaboratorial para Contagem de Células Somáticas em matriz "Leite cru adicionado de bronopol", provido pelo MAPA.

Os ensaios foram realizados com leite cru refrigerado obtido de tanques de propriedades rurais e/ou de animais individuais e considerou-se a possibilidade de mistura para obter a ordem de grandeza desejada, cuja variação se limita aos intervalos normais para o tipo de matriz. Ao leite foi adicionado 2-bromo-2-nitropropanodiol-1,3, o bronopol (MAPA, 2009).

O Programa Interlaboratorial para Contagem de Células Somáticas foi conduzido no período de outubro de 2008 a setembro de 2009, coordenado pelo LANAGRO-MG e contou com um número total de 15 laboratórios (MAPA, 2009).

Assim como os demais participantes, o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado recebeu mensalmente amostras de leite cru adicionado de bronopol para executar a contagem de células somáticas, por meio da técnica de análise instrumental de citometria de fluxo (BENTLEY, 1998), em conformidade com a IN 51/02.

Os ensaios foram executados dentro do intervalo máximo de 144h a contar do "tempo zero" definido para cada lote e mediante calibração do equipamento a não mais do que quinze dias da data de análise (MAPA, 2009).

A designação do valor de referência e da respectiva incerteza padrão referente aos materiais empregados foi feita por meio de valor de consenso, por meio de delineamento fatorial  $3A \times 3R \times 1r \times 1F$ , onde A corresponde ao número de analistas, R, de repetições (esfregaços) e r, de réplicas de um mesmo esfregaço. Como requisito de validação dos resultados adotou-se o limite de 5% para o coeficiente de variação. O valor designado e sua incerteza foram obtidos pelo

algoritmo A, conforme definido na Norma ISO 13528:2005. Foram avaliados os seguintes parâmetros estatísticos em cada rodada do programa: (1) Valores designados para cada material e sua incerteza padrão; (2) Avaliação da incerteza padrão do valor designado frente ao desvio padrão de proficiência laboratorial; (3) Homogeneidade e estabilidade dos materiais; (4) Desvio padrão de proficiência laboratorial relativo à rodada; (5) Estimativa do bias, D (diferença entre valor obtido e o designado); Bias laboratorial (D%); (6) z score; (7) z' score (Quadro 1); (8) parâmetros estatísticos de precisão: repetitividade e reprodutividade e desvios padrão respectivos (MAPA, 2009).

**Quadro 1.** Critérios de julgamento relativos ao z score e ao z' score (MAPA, 2009).

Critério	Conclusão
$z$ ou $z' \geq 3,0$	Ação corretiva
$3,0 > z$ ou $z' \geq 2,0$	Atenção
$2,0 > z$ ou $z' > -2,0$	Conformidade
$-3,0 < z$ ou $z' \leq -2,0$	Atenção
$z$ ou $z' \leq -3,0$	Ação corretiva

A análise dos dados expostos na tabela 1 permite verificar que os resultados das determinações de CCS realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado (LQL) com ambos os materiais de referência foram considerados "conformes", tendo em vista estarem contidos no intervalo equivalente ao valor designado  $\pm 2s$ , cujos limites inferior e superior são, respectivamente, 402,8 e 495,2. Além disso, foi possível observar que os desvios padrão de 4,2 e 7,1 foram inferiores ao desvio padrão de proficiência, equivalente a 23,1.

**Tabela 1.** Resumo dos resultados de CCS dos materiais de referência.

Padrão	CCS (CS/uL)
Média LQL (padrão 67CT21)	467
Desvio padrão	4,2
Média LQL (padrão 08HB75)	451
Desvio padrão	7,1
Média dos labs	477,4
Desvio padrão	23,1
Valor designado ajustado	449
Variação correspondente a $\pm 2\sigma$	$\pm 46,2$
Variação correspondente a $\pm 3\sigma$	$\pm 69,3$

Quando tratou-se de Bias, o desempenho do LQL também indica conformidade com o conjunto de resultados. Os valores de bias (D) absoluto e relativo (D%), respectivamente, de 21 e 4,68%, ficaram próximos aos obtidos pelo laboratório de referência, 27 e 6,01%. Além disso, estão contidos nos intervalos de resultados aceitos para estes parâmetros, que são -16 a 42, para D, e -3,56 a 9,35 para D%.

A avaliação baseada no “z” escore ratifica o bom desempenho do LQL, tendo em vista que os valores obtidos pelo laboratório da Embrapa Clima Temperado para z e z', respectivamente, de 0,91 e 0,88, são intermediários aos resultados mínimos, -0,69 e -0,67, e máximos, 1,82 e 1,77, obtidos no programa. Repetiu-se, neste caso, a similaridade aos resultados obtidos pelo laboratório de referência para z, 1,17, e z', 1,14. Ainda tomando por base os parâmetros z e z', os resultados das rodadas 5 a 8, asseguram posição de destaque ao LQL, já que no universo de 15 participantes, o laboratório faz parte do grupo de apenas cinco, cujos resultados apresentados não indicaram “atenção” ou “ação corretiva” em nenhuma das rodadas (quadro 1).

O bom desempenho do Laboratório da Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado no Programa Interlaboratorial para contagem de células somáticas (CCS) demonstra a competência técnica do Laboratório para gerar resultados estatisticamente confiáveis, utilizando a técnica da citometria de fluxo.

## Referências

ABNT. **NBR/ISO 17.025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 51, de 18 de set. de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 183, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 01, de 16 de janeiro de 2007. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 1, 17 jan. 2007. Seção 1.

PONÇANO, V. M. L. **Competência laboratorial e ensaios de proficiência: avanços e desafios**. São Paulo: Centro de Metrologia em Química - Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT, 2005. 7 p.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R.; et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 3 (supl.), p. 1129-1135, 2006.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

EVANGELISTA, D. T. **Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos**. 2008. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; et al. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

MAPA. Programa Interlaboratorial POA08PIL001, **Contagem de células somáticas em matriz “leite cru adicionado de Bronopol”**. Pedro Leopoldo: LANAGRO/MG, 2009. 69 p. Relatório fase VIII.

### Comunicado Técnico, 225



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

**Embrapa Clima Temperado**

**Endereço:** Caixa Postal 403

**Fone/fax:** (53) 3275 8199

**E-mail:** sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão 2009: 20 exemplares

### Comitê de publicações

**Presidente:** Ariano Martins de Magalhães Júnior

**Secretária- Executiva:** Joseane Mary Lopes Garcia

**Membros:** José Carlos Leite Reis, Ana Paula Schneid Afonso, Giovanni Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

### Expediente

**Supervisor editorial:** Antônio Luiz Oliveira Heberlê

**Revisão de texto:** Antônio Luiz Oliveira Heberlê

**Editoração eletrônica:** Sérgio Ilmar Vergara dos Santos