

Avaliação Externa da Qualidade em Microbiologia de Areias de praias - Estudo Piloto



Ana Paula Faria^{a+}, Helena Correia^{a+}, Susana Silva^a, Cristina Brito^a, Vera Clemente^a, Ana Cardoso^a, Cristina Verissimo^b, Raquel Sabino^b, Helena Simões^b, Raquel Rodrigues^c, Cecília Silva^c, Filipa Ferreira^c, João Brandão^{c*}

^a Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Epidemiologia, Unidade de Avaliação Externa da Qualidade;

^b Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Doenças infecciosas, Unidade de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas;

^c Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Saúde Ambiental, Laboratório de Microbiologia de Águas, Unidade de Água e Solo.

*Correspondência operacional do programa PNAEQ – pnaeq@insa.min-saude.pt

*Correspondência científica – joao.brandao@insa.min-saude.pt

Introdução e Objetivo

As areias das praias contêm por vezes microrganismos nocivos para a saúde humana, frequentemente em superiores às que existem na água. Atualmente (Brandão *et al.* 2002; Sabino *et al.* 2012; Solo-Gabriele *et al.* 2015) não existe regulamentação para a amostragem, análise e apreciação da qualidade microbiológica de areias. O Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), inserido no Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Portugal, implementou em 2015 um ensaio piloto no âmbito da avaliação externa da qualidade microbiológica de areias.

Um dos principais objetivos é a **harmonização da metodologia** utilizada nos laboratórios, para avaliar a quantificação e identificação de microrganismos indicadores, quer bacterianos quer fúngicos, nas areias de praias, através da avaliação do desempenho dos resultados interlaboratoriais.

Métodos

Em 2015 foi constituído um grupo de trabalho multidisciplinar que colaborou com o PNAEQ para a implementação de um ensaio piloto neste âmbito. Fizeram parte deste grupo de trabalho, para além dos elementos do PNAEQ, peritos na área de Microbiologia de Areias.

Para a quantificação **bacteriológica** foi selecionada uma areia previamente tratada, para inoculação pelo laboratório, com uma lentícula contendo uma ou mais estirpes bacterianas de referência para quantificação de Coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus*, em 3 réplicas. O tratamento estatístico foi realizado tendo em conta o valor de consenso obtido pela aplicação do Algoritmo A de acordo com o ponto 5.6 da norma ISO 13528:2005 (Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons). O algoritmo A dá uma estimativa robusta de localização, nomeadamente a média e o desvio padrão robustos dos dados aos quais é aplicado. O z-score, foi também calculado, de acordo com o ponto 7.4.1 da ISO 13528:2005.

Para a análise **micológica** foi enviada uma areia natural para contagem e identificação de fungos. Foi solicitada a contagem, em triplicado, solicitando-se o resultado final de quantificação expresso em ufc/g de amostra. Os resultados foram avaliados qualitativamente através da frequência de microrganismos identificados.

O ensaio piloto foi enviado para os 12 laboratórios pertencentes à rede MICROAREIAS, formada em 2013 (Sabino *et al.* 2013).

A distribuição das amostras foi efetuada para Portugal continental e Região Autónoma da Madeira, de acordo com as normas UN3373 e P650 da IATA.

Resultados

Foram recebidos 82% de respostas para a análise **bacteriológica**. Os resultados foram tratados estatisticamente com valor de consenso determinado pela aplicação do algoritmo A. Foi avaliada a quantificação para Coliformes totais, *E. coli* e *Enterococcus*, tendo em conta o método utilizado (Método de Número mais Provável-NMP-Colilert e Enterlert e/ou Filtração por membrana).

Foi elaborado um relatório estatístico de desempenho com discriminação para cada parâmetro, conforme a **tabela 1**, com representação gráfica dos resultados em histogramas (**imagem 1**).

Do total de resultados 93.7% apresentaram z-scores inferiores a | 2 |.

Amostra 1	Resultado	ID/Score	Viés	Apreciação	Alvo	Incerteza	N Resp	Condições ensaio
Bactérias Coliformes	1	-0.65	-0.84	Bom	1.84	0.42	15	Colilert
Bactérias Coliformes	1	-0.07	-0.07	Excelente	1.07	0.26	15	Filtração por membrana
<i>E. coli</i>	1	-0.65	-0.84	Bom	1.84	0.42	24	Colilert
<i>E. coli</i>	1	-0.04	-0.04	Excelente	1.04	0.25	24	Filtração por membrana
<i>Enterococcus</i>	144	-0.68	-431.06	Bom	575.06	228.42	12	Enterolert
<i>Enterococcus</i>	305	-0.67	-93.17	Bom	398.17	37.90	21	Filtração por membrana

1 – Resultado: Resultado obtido pelo laboratório na quantificação do microrganismo

2 – ID/Score: Índice de desvio/z-score obtido através da fórmula $ID/Score = \frac{X_i - \bar{X}}{s}$

3 – Viés: Diferença entre o valor do laboratório e o valor alvo

4 – Apreciação: Definida qualitativamente através do valor do z-score (ID/Score) consoante a tabela

5 – Alvo: Valor de consenso calculado através do Algoritmo A

6 – Incerteza: Incerteza associada ao alvo

7 – N Resp: Número total de respostas recebidas para cada parâmetro

8 – Condições Ensaio: Método para qual é efetuado o tratamento estatístico

Apreciação	
Excelentes	0 < ID < [0,5]
Bons	[0,5] < ID < [2,0]
Satisfatórios	[2,0] < ID < [3,0]
Insatisfatórios se	ID > [3,0]

Tabela 1: Exemplo da tabela com resultados estatísticos incorporada no relatório individual de cada participante

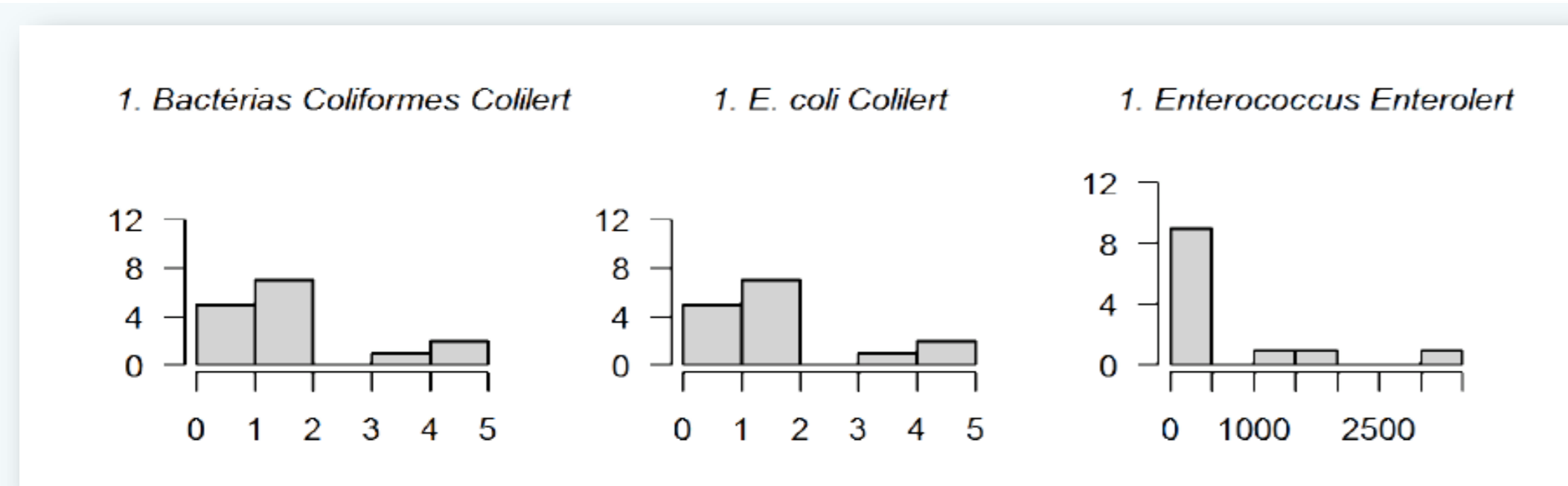


Figura 1: Exemplo da componente gráfica incorporada no relatório individual de cada participante, em que a linha a tracejado representa o resultado dado pelo participante e a linha a cheio o valor alvo

Para a análise **micológica**, após uma primeira análise dos resultados constatou-se que o reduzido número de respostas (6) não permite a utilização do método robusto de cálculo - Algoritmo A.

Efetou-se uma análise de frequência para cada um dos microrganismos identificados (leveduras, fungos potencialmente patogénicos alergogénicos e dermatófitos) por laboratório participante, sendo identificados 11 fungos, tendo 3 laboratórios identificado o *Penicillium* (**figura 2**).

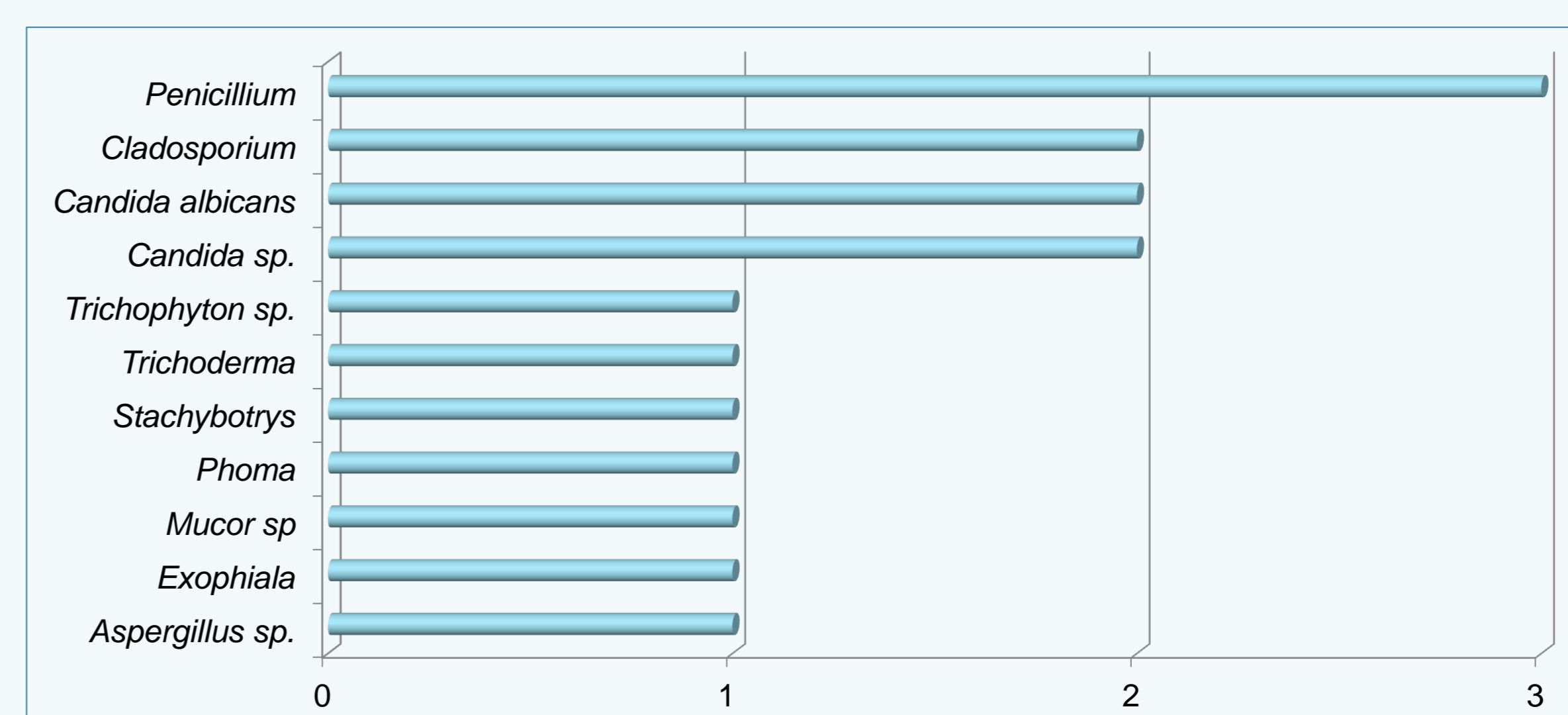


Figura 2: Frequências dos microrganismos identificados pelos laboratórios participantes.

Conclusões

- ▶ O ensaio piloto permitiu o levantamento das dificuldades na avaliação do desempenho dos laboratórios participantes relativamente à presença, quantificação e identificação de microrganismos indicadores, quer bacterianos quer fúngicos nas areias de praias.
- ▶ De acordo com a análise dos resultados neste ensaio e após conclusões da reunião com os participantes, serão implementadas melhorias no programa em 2016:
 - ▶ Para além das réplicas, será solicitado o envio de resultado final para a quantificação de **bactérias**, de acordo com a prática laboratorial
 - ▶ Envio de duas amostras para análise **micológica**, uma para quantificação de leveduras e bolores e outra para identificação de leveduras.
 - ▶ Será ainda fornecido a título formativo, uma cultura de fungo filamentosos para identificar como sendo ou não um fungo pertencente ao grupo dos fungos dermatófitos.

Referências

- Brandão J, *et al.* (2002) *Qualidade Microbiológica de areias de Praias Litoriais - Relatório Final*. Alfragide
- Sabino R., *et al.* (2011) *Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal*. Marine Pollution Bulletin, 62(7), 1506–1511.
- R Sabino, *et al.* (2013) *Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: Implications to public health*. Science of The Total Environment 12/2013; 472C:1062-1069. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.11.091
- Solo-Gabriele HM, *et al.* (2015) *Beach sand and the potential for infectious disease transmission: observations and recommendations*. Journal of the Marine Biological Association of the UK 05/2015; DOI:10.1017/S0025315415000843